

学内グラント 報告書

平成25年度 学内グラント終了時報告書

丸木記念特別賞受賞

統合的トランスクリプトーム解析で明らかにする
脂肪・骨芽細胞分化調節メカニズム

研究代表者 水野 洋介 (ゲノム医学研究センター)

研究分担者 仲地 豊*

緒言

間葉系幹細胞は、脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、筋細胞などの様々な細胞種に分化する能力を有するが、特に個々の間葉系幹細胞が脂肪細胞と骨芽細胞のどちらに分化するか、そのバランスを調節するメカニズムは、骨粗鬆症や生活習慣病の発症や病態と密接に関連する。

我々はこれまで、骨髄間葉系幹細胞が骨芽細胞や脂肪細胞へ分化する際の遺伝子制御ネットワークを描出してきた。骨芽細胞や脂肪細胞への分化過程で重要な機能を担っている遺伝子を調べるため、それぞれの分化過程において極めて詳細なタイムポイントで遺伝子発現解析を行ってきた。その結果、転写因子 Id4 が骨芽細胞分化を促進、脂肪細胞分化を抑制する遺伝子であることを突き止めた¹⁾。また、マイクロRNA (miRNA) である miR-125b と miR-210 が、骨芽細胞分化をそれぞれ抑制、促進することを明らかにした^{2,3)}。これらの他にも、様々な遺伝子や miRNA がその発現量に応じてそれぞれの分化の方向性に関与する事を明らかにしてきた。

遺伝子がゲノムDNAから転写されてRNAができ、それを鋳型として翻訳が起こりタンパク質が作られるセントラルドグマは古くから知られているが、実際にはその個々の過程で多くの複雑かつ精細な制御機構があることが次々と明らかになっている。ゲノム上の1つの遺伝子座位からは1つの決まった一次構造を持つRNAのみが作られるのではなく、転写開始点や使われるエクソンが異なる多くのアイソフォームが存在することが多くの遺伝子座位で明らかになっており、これらのRNAアイソフォームが生体内の組織や細胞の種類によって繊細に使い分けられている事実も多く報告されてきている。例えば、転写

因子 PPAR γ には少なくとも $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$ という転写開始点や利用エクソンが異なる3つのアイソフォームが知られており、それぞれが異なる細胞種で異なる働きを有している。これらの中で脂肪細胞分化に必要な働きを持つのはアイソフォーム $\gamma 2$ である⁴⁾。こうした現象は単に個々の遺伝子座位からのRNA発現量を調べるだけでは見逃されてしまう重要な作用メカニズムである。さらに、タンパク質をコードしていない non-coding RNA (ncRNA) が機能性 RNA として生体内の様々な現象に関与していることが明らかになってきている。ncRNA の中でも miRNA についてはこれまで新知見が最も盛んに報告されてきたが、近年になっては Large non-coding RNA (lncRNA) をはじめとする miRNA 以外の ncRNA の機能も次々と明らかになってきている^{5,6)}。

そこで本研究では、間葉系幹細胞が脂肪細胞分化および骨芽細胞分化する際の調節に関する遺伝子アイソフォームや ncRNA を同定するために、ヒト間葉系幹細胞を脂肪細胞分化、骨芽細胞分化させたサンプルを用いて、全遺伝子と ncRNA のエクソン毎の発現量をトランスクリプトームアレイを用いて網羅的に調べた。

材料と方法

1. 間葉系幹細胞サンプルの調整

3種類のヒト間葉系幹細胞をロンザ社より購入した。増殖用の基本培地 (MSCGM Mesenchymal Stem Cell Growth Mediumu BulletKit, ロンザ社) を用いて細胞を増殖させた後、脂肪細胞分化誘導および骨芽細胞分化誘導を行った。脂肪細胞分化誘導では、インスリン、デキサメタゾン、ロシグリタゾン、3-イソブチル-1-メチルキサンチンを基本培地に添加した誘導用培地を用いた。2日後に誘導用培地を除去し、基本培地に交換して培養を継続した。骨芽細胞分化誘導では、

*ゲノム医学研究センター

培養の全期間において、基本培地に BMP-4 (R&D 社) を 200 ng/ml の濃度で添加した培地を用いた。分化誘導を行わない対照サンプルとして基本培地のみでの培養も併せて行った。分化誘導開始直前 (0 時間)、開始 2 時間後、3 日後、6 日後、10 日後の細胞を回収し、miRNeasy mini kit (Qiagen 社) により small RNA を含む全 RNA を抽出した。サンプルから DNA を除去するため、RNA 抽出作業時に DNase 処理を行った。

2. 脂肪・骨芽細胞分化の確認

分化誘導サンプルの分化を確認するため、脂肪細胞、骨芽細胞分化の遺伝子マーカーの発現を逆転写定量 PCR (qRT-PCR) 法を用いて定量した。まず、前項で得られた RNA を用いて、逆転写酵素 (Bioscript, Biotek 社) を用いて cDNA を合成した。得られた cDNA 産物を鋳型として、各遺伝子特異的プライマー (脂肪細胞分化マーカーとして PPAR γ 、骨芽細胞分化マーカーとしてオステオカルシン) を用いて、Power SYBR Green (ライフテクノロジーズ社) による定量的 PCR を行った。更に、脂肪細胞分化誘導処理、骨芽細胞分化誘導処理したサンプルについてそれぞれオイルレッド染色、アルカリフォスファターゼ染色により分化を確認した。

3. トランスクリプトームアレイ解析

各サンプル RNA 100 ng を用いて、アフィメトリクス社 Human Transcriptome Array 2.0 アレイ解析実験を行った。アフィメトリクス社のプロトコルに従い、逆転写反応、二本鎖 cDNA 合成、インビトロ転写反応、一本鎖 cDNA 再合成、cDNA 断片化反応・標識反応を行って、ハイブリダイゼーション用のサンプルを調整した。調整したサンプルをアレイに充填し、45°C で 16 時間回転させながらインキュベーションし、アレイへのハイブリダイゼーションを行った。その後、

Fluidics Station (アフィメトリクス社) を用いてアレイを洗浄・染色し、専用スキャナにて各プローブスポットの蛍光強度を定量した。得られたデータ (CEL ファイル) からコンピュータ上で Expression Console アプリケーション (アフィメトリクス社) を用いて数値化と遺伝子対応付けを行い、Transcriptome Analysis Console アプリケーション (アフィメトリクス社) を用いて各遺伝子のエクソン毎の発現量とその変動量を可視化した。

結果

1. 脂肪・骨芽細胞分化の確認

a) 脂肪細胞分化の確認

脂肪細胞分化誘導後 6 日目のサンプルを用いて、PPAR γ 遺伝子発現量を定量的 PCR 法にて定量した結果、未分化の細胞と比較して PPAR γ 発現量が 10 倍以上上昇していることが分かった (図 1)。またオイルレッド染色により、実際に油滴の蓄積を確認した。

b) 骨芽細胞分化の確認

骨芽細胞分化誘導後 6 日目、12 日目のサンプルを用いて、オステオカルシン遺伝子発現量を定量的 PCR 法にて定量した結果、未分化の細胞と比較してオステオカルシン発現量が 5 倍程度まで上昇していることが分かった (図 2)。またアルカリフォスファターゼ染色により、アルカリフォスファターゼ活性陽性の細胞を確認した。

2. トランスクリプトームアレイ解析

a) 転写物単位での発現変動確認

前項の解析により脂肪細胞分化、骨芽細胞分化の誘導ができた細胞検体より抽出した RNA を用いて、トランスクリプトームアレイ解析を行った。Transcriptome Analysis Console アプリケーションの

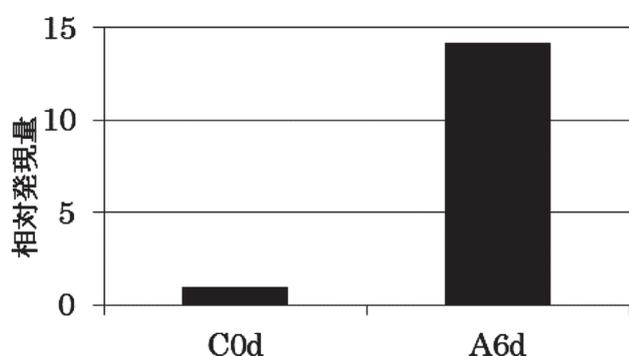


図 1. 脂肪分化細胞における PPAR γ 遺伝子の発現上昇。未分化の細胞 (C0d) と比べて、脂肪細胞分化誘導後 6 日目の細胞 (A6d) では、PPAR γ 遺伝子 mRNA の発現量が約 14 倍にまで上昇した。

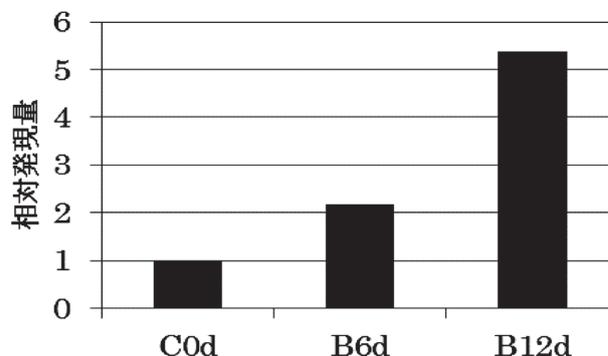


図 2. 骨芽細胞分化におけるオステオカルシン遺伝子の発現上昇。未分化の細胞 (C0d) と比べて、骨芽細胞分化誘導後 6 日目 (B6d)、12 日目 (B12d) の細胞では、オステオカルシン遺伝子の発現量がそれぞれ約 2.1 倍、5.3 倍にまで上昇した。

Gene level expression analysisモードを用いて視覚化した例を図3と図4に示す。脂肪細胞分化誘導サンプルにおいては、FABP4やADIPOQなど、脂肪細胞分化時に発現が上昇する代表的な遺伝子の発現が上昇していることが確認できた(図3)。また、骨芽細胞分化誘導サンプルでは、オステオモジュリンやHEY1, MMP13などの骨芽細胞分化誘導時に発現が上昇することが知られている遺伝子の発現が上昇していることが分かった(図4)。

b) エクソン単位での発現変動とncRNA 発現変動の確認

前項で用いたアレイデータについて、Transcriptome Analysis ConsoleアプリケーションのAlternative splicing analysisモードを用いてデータの解析と可視化を行った。視覚化データの一例を図5に示す。この例では、脂肪細胞分化誘導後6日目のサンプルと分化誘導を行わずに6日間培養したコントロール細胞との間で、PPAR γ 遺伝子について、RNAサンプルに含まれる各エクソンの存在比が示されている。PPAR γ 遺伝子は、PPARG1, PPARG2等の、転写開始点が異なるアイソフォームがいくつか知られており、脂肪細胞分化時にはPPARG2のアイソフォームの発現量が選択的に亢進し、脂肪細胞分化を促進させる役割があることが知られている。今回の解析において、脂肪細胞

分化6日目では、PPARG2のアイソフォームが特異的に発現上昇していることを確認することができた(図5)。次に、脂肪細胞分化と骨芽細胞分化それぞれ6日目のサンプルと、分化誘導を行わずに6日間培養したコントロール細胞との間で、転写開始点やエクソンの組み合わせが異なる遺伝子の同定を試みた。各遺伝子の中で、相対的な発現量が5倍以上変動したエクソンを含む遺伝子の数をカウントしたところ、表1に示した数の遺伝子において、エクソンの相対的な発現量が5倍以上変動していた。また、同様のサンプルにおいて、表1のncRNAの項目に示した数のncRNAで5倍以上の発現変動が観察された。

考 察

間葉系幹細胞の脂肪細胞分化・骨芽細胞分化時における制御ネットワークを解析する手法として、これまでに従来の遺伝子単位での網羅的遺伝子発現解析が我々の研究を始めとして多く行われてきており、様々な知見が蓄積されてきた。一方で、各遺伝子から生み出されるRNAは全て一様ではなく、転写開始点が異なっていたり、選択的スプライシングなどにより多様なアイソフォームが存在し、特定のアイソフォームが細胞内の特定のイベントに重要な役割を示す事が分かってきた。本研究においては、正確に各遺

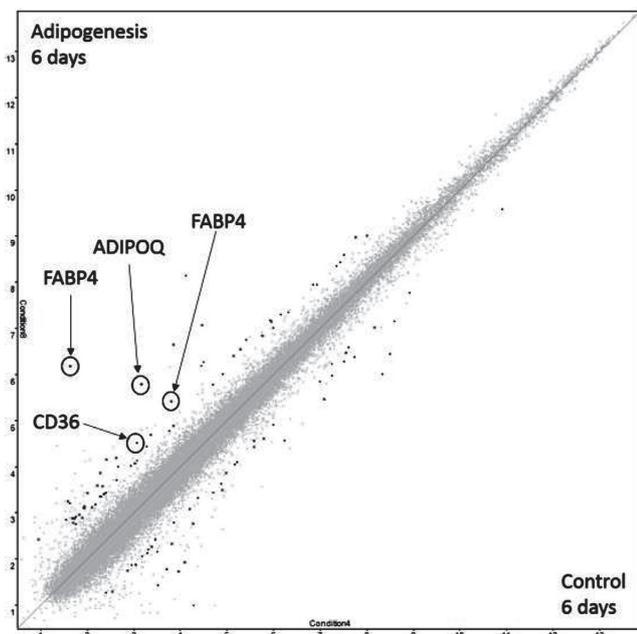


図3. 脂肪細胞分化6日目の網羅的遺伝子発現変動パターン。各転写物の発現量について、脂肪細胞分化誘導6日目のサンプルをY軸、分化誘導を行わないコントロールサンプルをX軸においた散布図。脂肪細胞で発現する代表的な遺伝子の発現上昇が認められた。

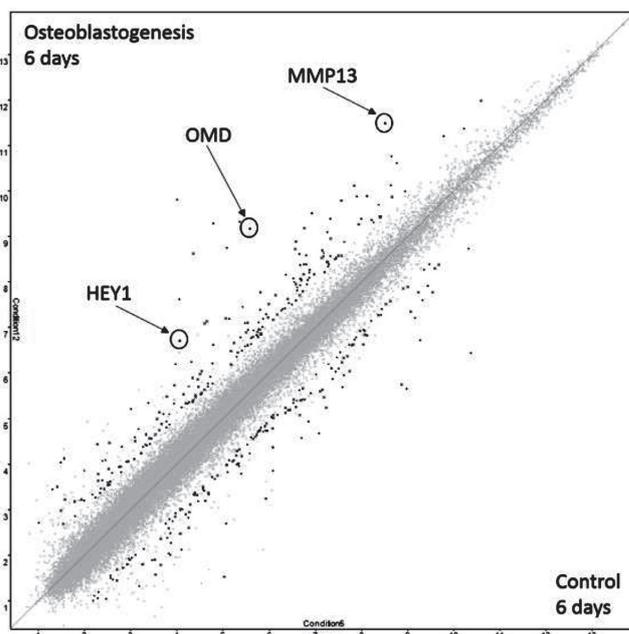


図4. 骨芽細胞分化6日目の網羅的遺伝子発現変動パターン。各転写物の発現量について、骨芽細胞分化誘導6日目のサンプルをY軸、分化誘導を行わないコントロールサンプルをX軸においた散布図。骨芽細胞で発現する代表的な遺伝子の発現上昇が認められた。

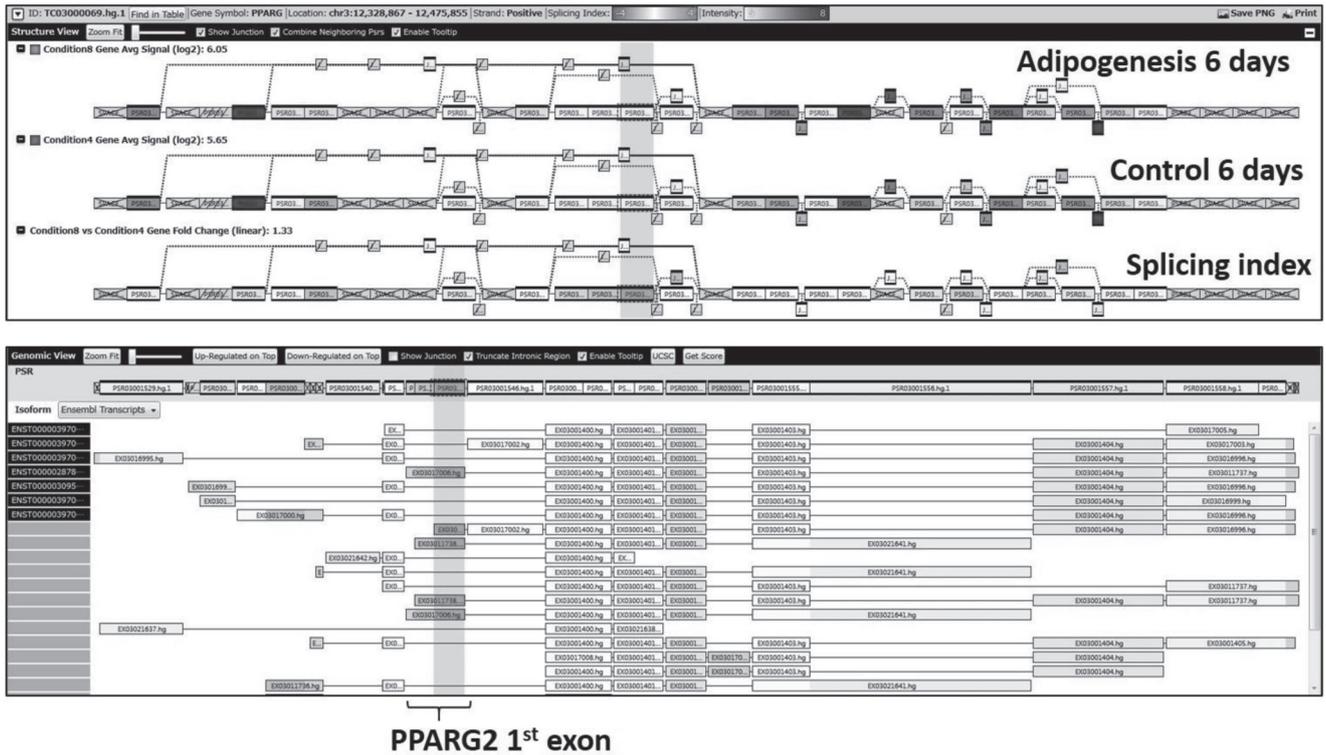


図 5. 脂肪細胞分化6日目のサンプルにおける、PPARG 遺伝子エクソンの発現変動パターン. 上段は、1列目が脂肪分化誘導後6日目、2列目が分化誘導無しのコントロール6日目サンプルについて、PPARG 遺伝子におけるエクソン毎の発現量を示している. 上段3列目は、エクソン毎の相対的な発現比を表す Splicing index の数値が可視化されている. 中央の縦帯で示されたエクソンが PPARG2 遺伝子の第一エクソンである. また下段では、既存の各種データベースに収録されている PPARG 遺伝子のアイソフォームを示している. 中央やや左の縦帯で示されたエクソンが PPARG2 遺伝子の第一エクソンである. 脂肪分化誘導後6日目のサンプルでは、PPARG2 遺伝子の第一エクソンの利用度合いが高い事が示されている.

表 1. Gene の項目では、各遺伝子の中で相対的な発現量が5倍以上変動したエクソンを含む遺伝子の数をカウントした. ncRNA の項目では、発現量が5倍以上変動したncRNA の数をカウントした.

	Adipogenesis		Osteoblastogenesis	
	6 days		6 days	
	Up	Down	Up	Down
Gene	39	25	56	58
ncRNA	1	0	4	1

伝子のエクソン毎の発現定量やncRNAの発現定量を網羅的に行うことができるトランスクリプトームアレイを用いて、転写開始点やスプライシングパターンが異なるアイソフォームやncRNAの発現量を定量した. その結果、脂肪細胞分化、骨芽細胞分化のそれぞれの過程において、特定のアイソフォームの発現が大きく

変動する遺伝子と、分化の過程で発現が大きく変動するncRNAを見出すことができた. 今後はこれらのアイソフォームとncRNAについて、細胞分化にどのように影響を及ぼしているのか、そのメカニズムを解明し、骨粗鬆症や生活習慣病に対する創薬や診断・治療等の臨床へ展開していく事が期待される.

謝 辞

この研究はゲノム科学部門の岡崎康司教授の助言, 監督の下に遂行されました。また, 細胞サンプルの調整にはゲノム科学部門の八塚由紀子助手に多大なご協力を頂きました。またゲノム科学部門の徳澤佳美研究員には適切な助言を頂きました。深く感謝いたします。

参考文献

- 1) Tokuzawa Y, Nakachi Y, Kanesaki-Yatsuka Y, Mizuno Y, Okazaki Y, et al. Id4, a new candidate gene for senile osteoporosis, acts as a molecular switch promoting osteoblast differentiation. *PLoS Genet* 2010;6(7):e1001019.
- 2) Mizuno Y, Tokuzawa Y, Kanesaki-Yatsuka Y, Okazaki Y, et al. miR-125b inhibits osteoblastic differentiation by down-regulation of cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;368(2):267-72.
- 3) Mizuno Y, Tokuzawa Y, Yatsuka-Kanesaki Y, Okazaki Y. miR-210 promotes osteoblastic differentiation through inhibition of AcvR1b. *FEBS Lett* 2009;583(13):2263-8.
- 4) Ackert-Bicknell C and Rosen C. The Genetics of PPAR γ and the Skeleton. *PPAR Res* 2006;2006:93258.
- 5) Kornfeld JW, Brüning JC. Regulation of metabolism

by long, non-coding RNAs. *Front Genet* 2014;5(57):eCollection.

- 6) Guan D, Zhang W, Zhang W, Liu GH, Belmonte JC. Switching cell fate, ncRNAs coming to play. *Cell Death Dis* 2013;4:e464.

研究成果リスト

学会発表

- 1) 水野洋介, 仲地豊, 徳澤佳美, 兼先-八塚由紀子, 岡崎康司. 脂肪・骨芽細胞分化を制御する非コードRNAの探索, NGS現場の会第三回研究会, 2013年9月4日, 神戸
- 2) 水野洋介, 仲地豊, 徳澤佳美, 兼先-八塚由紀子, 岡崎康司. 間葉系幹細胞分化を調節するキー転写因子による, マイクロRNAを介した細胞分化制御, 第36回日本分子生物学会年会, 2013年12月3日, 神戸
- 3) 仲地豊, 水野洋介, 徳澤佳美, 山下泉, 八塚由紀子, 岡崎康司. CAGELOH (CAGE Loci Oriented Heatmap) によるマウス間葉系幹細胞の脂肪細胞・骨芽細胞分化 トランスクリプトーム統合解析, 第36回日本分子生物学会年会, 2013年12月5日, 神戸
- 4) 仲地豊, 水野洋介, 徳澤佳美, 山下泉, 八塚由紀子, 岡崎康司. 脂肪細胞及び骨芽細胞への2方向性分化で機能する制御因子の探索, 東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻人類学演習IV・談話会, 2013年11月29日, 東京

学内グラント 報告書

平成25年度 学内グラント終了時報告書

丸木記念特別賞受賞

生体ネットワークの調和を目指す再生医療に向けた
神経および骨再生を担う分子の探索

研究代表者 佐藤 毅 (大学病院 歯科・口腔外科)

研究分担者 松本 征仁¹⁾, 榎木 祐一郎²⁾, 千田 大²⁾

緒言

顎顔面領域における腫瘍・炎症・骨折などによる骨欠損・変形に対する治療法としては再生医療が最も期待される。しかしながら、形態・機能を回復するのが困難な場合も少なくなく、たとえば顔面骨の大部分が欠損すると審美性や咀嚼機能の低下、さらには感覚神経麻痺が引き起こされる。とりわけ下顎骨は骨内部を太い知覚神経・血管が伴走するという特徴を持ち、単なる骨組織の再生をするだけでは機能の回復は極めて困難といえる。生体には各臓器間のネットワークシステムが存在し、内分泌系(血管系)・神経系がそれを担っており、生体反応を制御している。近年の研究から、骨組織はさまざまな臓器により制御されていることが明らかとなりつつあり¹⁾、生体ネットワークの中でいかに骨を再生させるかを考えなければならない。血管-神経ネットワークは、このシステムを構築する重要な概念であり、血管-神経ネットワークの解明は生体の有機的応答を理解するために必要である。近年の再生医療では1つの器官の再生を目指す研究が主であるが、生体では1つの器官が独立して存在するわけではなく、器官を支配する血管・神経系のネットワークも考慮しなければならず、臓器と血管そして臓器と神経の相互作用の理解も必要である。われわれはこれまでに神経系による骨代謝の制御機構について解析を行ってきた。神経伝達物質であるアセチルコリンが骨芽細胞に作用して増殖を促進し分化を抑制することを見出し²⁾、骨のみならず様々な臓器においてアセチルコリンが細胞間ネットワークシグナルとしての役割を担っていることを提唱してきた³⁾。最近、われわれは感覚神経が海綿骨にまで及び、感覚神経由来のsemaphorin 3Aが骨代謝を制御

するという骨代謝の新たな調節機構を発見した⁴⁾。

本研究では、神経細胞と骨芽細胞との相互作用を解明することを目指した。神経細胞は骨膜において神経突起を介して骨芽細胞と接触していると考えられ、神経細胞と骨芽細胞との接触による双方の細胞への生理応答に関する影響を検討する必要がある。そこで、神経細胞と骨芽細胞の接触型あるいは非接触型共存培養系における、骨芽細胞および神経細胞の分化への影響を調べるとともに、これらを制御する因子の探索を目的として本研究を行った。

材料と方法

1. 細胞培養

細胞株として神経細胞に分化する能力を有するラット褐色細胞腫細胞株PC12およびマウス骨芽細胞様細胞株MC3T3-E1を、培地として5% fetal bovine serum (FBS), 10% horse serum, 1% penicillin/streptomycin (P/S) 含有 Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) 培地を用いた。37°C・CO₂濃度5%にて培養し、2日おきに継代した。

2. 共存培養法

非接触型培養法では、MC3T3-E1をTranswell Permeable Supports (24 well) 0.4 μm polyester (Corning)のwell (growth area, 1.9 cm²)に3 × 10⁴/cm²で播種し、PC12をinsert membrane (growth area, 0.33 cm²)に3 × 10⁴/cm²で播種した。接触型培養法では、24 well plate (Corning)あるいは8 well chamber slide (BD Falcon)にMC3T3-E1およびPC12をそれぞれ3 × 10⁴/cm²で播種した。

3. 石灰化アッセイ

24 well plateで接触型共存培養あるいは非接触型培養を行った。培養19日目で、氷冷した70%エタノールにて固定し、洗浄後にAlizarin red 染色液で染色を行った⁵⁾。

1) ゲノム医学研究センター ゲノム科学部門

2) 大学病院 歯科・口腔外科

4. 免疫染色

8 well chamber slideで接触型共存培養を行った。培養3日後、4% paraformaldehydeにて固定し、anti-connexin43抗体 (Cell Signal) および anti-neurofilament-L抗体 (Cell Signal) を用いて免疫染色を行った。2次抗体としてAlexa Fluor488 goat anti-mouse IgG (Life Technologies) およびAlexa Fluor568 goat anti-rabbit IgG (Life Technologies) を用いた。Vectashield (Vector)にて封入し蛍光顕微鏡で観察した。

5. リアルタイムPCR

細胞を回収後、ISOGEN (ニッポンジーン)にて全RNAを抽出し、High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix (Life Technologies) を用いてcDNA合成を行った。TaqMan Gene Expression Master Mix (Life Technologies) を使用し、TaqMan プライマーとしてALP (Mm01187113_g1), *Osteocalcin* (Mm03413826_mH), *GAPDH* (Mm03302249_g1) を用いて、Applied Biosystems Prism 7900HT Sequence Detection System (Life Technologies) で検出した。遺伝子発現はGAPDHに対する相対値を計算した。

6. DNAマイクロアレイ

接触型共存培養後0時間、24時間および72時間で

細胞を回収してISOGENにて全RNAを抽出し、Amino Allyl MessageAMP II aRNA Amplification Kit (Life Technologies)にてCy3あるいはCy5で標識した。マイクロアレイは3D Gene Mouse Oligo Chip 24K (TORAY) および3D Gene Rat Oligo Chip 24K (TORAY)を用いた。ハイブリダイゼーション・シグナルのスキューンはScanArray Express Scanner (PerkinElmer)にて行い、GeneSpringGX11.5 (Molecular Devices)にて解析した。各遺伝子の検出シグナルはグローバルノーマライゼーション法により標準化した。

結果

1. 神経系細胞と骨芽細胞の接触型共存培養にて骨芽細胞分化が促進される

PC12とMC3T3-E1を接触型共存培養させたところ、19日目で石灰化が促進された(図1)。一方でPC12をTranswellメンブレンに播種し、MC3T3-E1をプレートに播種し、非接触型共存培養を19日間行ったところMC3T3-E1の石灰化は促進されなかった(図1)。次に接触型共存培養にて3日間培養してRNAを採取し、骨芽細胞分化マーカーの発現を調べたところ、ALPおよびOsteocalcin遺伝子の発現が上昇していた(図2)。

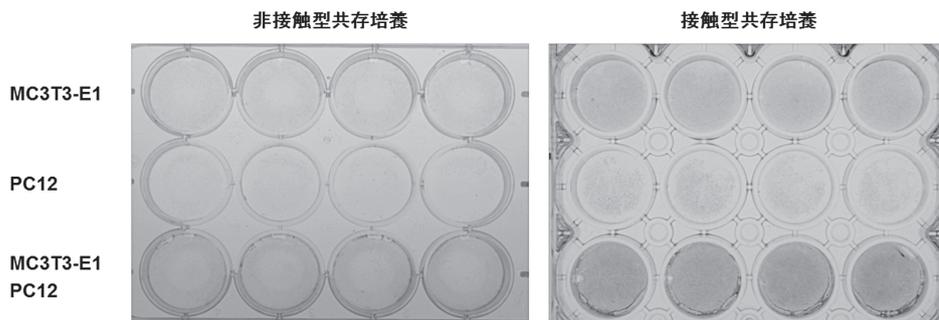


図 1.

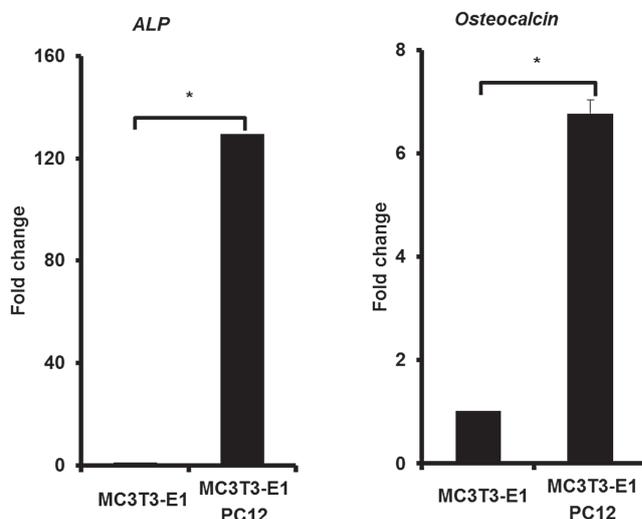


図 2.

2. 神経系細胞と骨芽細胞の接触型培養にて神経分化が促進される

PC12とMC3T3-E1を接触型共存培養させ、3日間培養したところ、神経分化マーカーであるneurofilament Lの発現が上昇していた(図3)。

3. 神経系細胞と骨芽細胞の接触型共存培養における遺伝子発現の網羅的解析

共存培養後0時間から24時間で発現が2倍以上上昇し、72時間後も発現が維持または上昇

するマウス遺伝子群が1058遺伝子、0時間から24時間で発現が0.5倍以下に低下し、72時間後もさらに発現が低下するマウス遺伝子群が390遺伝子であった(図4)。一方、0時間から24時間で発現が2倍以上上昇し、72時間後も発現が維持または上昇するラット遺伝子群が200遺伝子、0時間から24時間で発現が0.5倍以下に低下し、72時間後もさらに発現が低下するラット遺伝子群が3遺伝子であった(図5)。

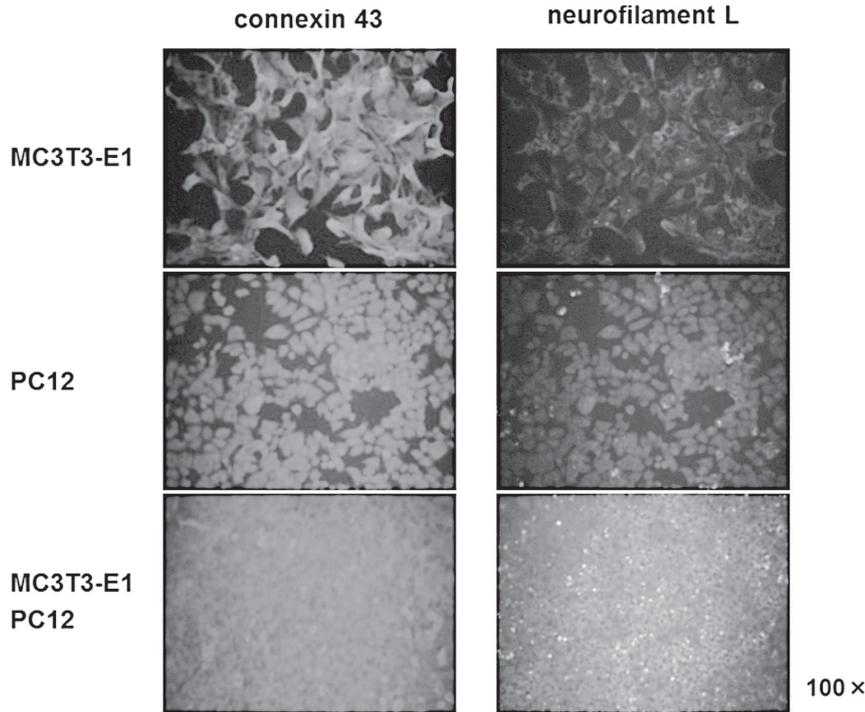


図 3.

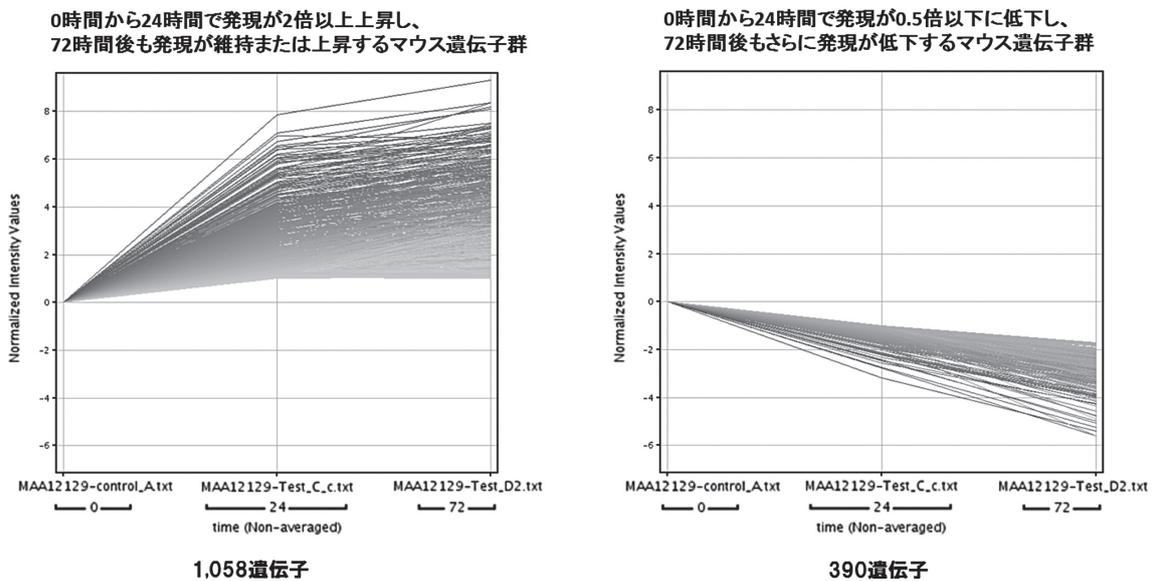


図 4.

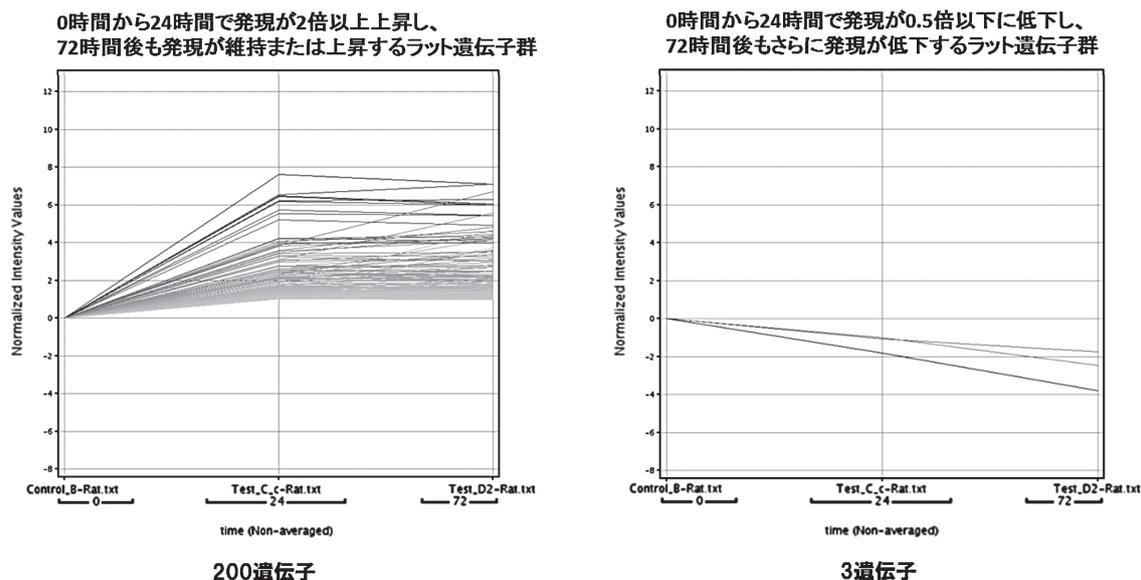


図 5.

考 察

今回の研究では神経系細胞と骨芽細胞の相互作用について *in vitro* での実験を行った。神経細胞と骨芽細胞を接触型共存培養で行うことで、骨芽細胞の分化が誘導されるが、非接触型共存培養では誘導されなかったことから、神経細胞による骨芽細胞分化の促進には細胞接触が重要である。最近、われわれは *in vivo* において神経系が骨形成を促進させることを示した⁴⁾。今回は *in vitro* においても神経系細胞が骨芽細胞の分化を促進させることが明らかとなった。

また、接触型共存培養では神経系細胞の分化マーカー発現が上昇していることから、神経分化も促進される可能性が示唆された。これまでに骨芽細胞が神経細胞を促進する報告はない。

さらに、経時的に発現の上昇する遺伝子群を調べたところ、ラットよりもマウスで非常に多いことがわかった。これらの遺伝子の中で骨芽細胞分化に関与するマウスの遺伝子および神経分化に関与するラットの遺伝子が存在するかどうかは今後検討する予定である。

参考文献

1) Karsenty G, Ferron M. The contribution of

bone to whole-organism physiology. *Nature* 2012;481(7381):314-20.

2) Sato T, Abe T, Chida D, Nakamoto N, Hori N, Kokabu S, et al. Functional role of acetylcholine and the expression of cholinergic receptors and components in osteoblasts. *FEBS Lett* 2010;584(4):817-24.

3) Sato T, Chida D, Iwata T, Usui M, Hatori K, Abe T, et al. Non-neuronal regulation and repertoire of cholinergic receptors in organs. *BioMol Con* 2010;1(5-6):357-66.

4) Fukuda T, Takeda S, Xu R, Ochi H, Sunamura S, Sato T, et al. *Sema3A* regulates bone mass accrual through sensory innervations. *Nature* 2013;497(7450):490-3.

5) Sato T, Abe T, Nakamoto N, Tomaru Y, Koshikiya N, Nojima J, et al. Nicotine induces cell proliferation in association with cyclin D1 up-regulation and inhibits cell differentiation in association with p53 regulation in a murine pre-osteoblastic cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;377(1):126-30.

研究成果リスト

なし

学内グラント 報告書

平成25年度 学内グラント終了時報告書

小児及び若年者神経膠腫における予後因子としての
ヒストン H3.3 遺伝子変異の解析

研究代表者 安達 淳一 (国際医療センター 脳神経外科/脳脊髄腫瘍科)

研究分担者 西川 亮*

緒言

神経膠腫の予後を予測する分子マーカーとして現在確立している因子としては、MGMT (*O*⁶-methylguanine-DNA methyltransferase) 遺伝子プロモーターのメチル化の有無、IDH1 (Isocitrate dehydrogenase 1) 遺伝子の変異の有無、染色体 1p/19q の共欠失の有無の3つが挙げられる。すなわち、MGMT プロモーターメチル化の存在、或いは染色体 1p/19q 共欠失の存在は grade 3, 4 神経膠腫で、IDH1 変異の存在は grade 2~4 神経膠腫で予後良好因子と言われている¹⁾。しかしながら、これらの事実は成人神経膠腫に当てはまるものであり、小児や若年者神経膠腫での解析から得られたものではない。小児神経膠腫は、その発生や進展に關与する遺伝子異常は成人神経膠腫とは明らかに異なり、予後予測因子として確立された分子マーカーは現時点では存在しない^{2,3)}。

最近、20歳以下の小児及び若年者の神経膠腫のうち、びまん性脳幹神経膠腫の70%以上、テント上神経膠腫の約30%でヒストンH3.3タンパク質をコードする遺伝子のコドン27か、コドン34のアミノ酸を変化させる変異の存在が確認された^{4,5)}。ヒストンH3.3の機能に変化が生じると、ヌクレオソームの構造や機能が変わり、遺伝子の正常な転写調節が困難になったり、テロメアが不安定となり細胞の不死化に繋がると言われている⁶⁾。Khuong-Quang らはヒストンH3.3遺伝子変異のうち、コドン27のアミノ酸 lysine が methionine に置き換わった (K27M) 症例では予後が不良であったと報告している⁷⁾が、症例数が少ないため予後因子となりうるかどうかは现阶段では判然としない。

そこで、今回、我々は当施設での小児及び若年者

神経膠腫 33 例を用い、ヒストンH3.3 遺伝子のコドン27とコドン34の変異につき解析を行い、臨床データとの関連を比較して、ヒストンH3.3 遺伝子変異が小児及び若年者神経膠腫の予後を予測する分子マーカーになりうる可能性につき検討することとした。

症例、方法

画像診断で神経膠腫が疑われ、インフォームドコンセントが取得できた患者 (20歳未満の小児及び若年者が患者なので、その保護者から取得) を対象とした。当科にて手術で腫瘍組織が得られた初発の小児~若年のテント上下グリオーマ33例を対象とした。内訳はlow-grade glioma (LGG) が12例、high-grade glioma (HGG) が21例であった。手術時に採取した腫瘍組織を、UltraClean Tissue & Cell DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories 社) を用いてDNAを採取した。抽出し精製したDNAを、LightCycler480システム (ロシュ・ダイアグノスティクス) を用いた高解像能融解曲線分析法にて、まずヒストンH3.3 遺伝子のコドン27及びコドン34に変異がないかどうかのスクリーニングを行った。高解像能融解曲線分析法の詳細は以下の条件とした。まず、目的のヒストンH3.3 遺伝子のコドン27及びコドン34を夾んでPCRで増幅した。PCRのプライマーは Khuong-Quang ら⁷⁾の報告に基づいてデザインした (表1)。DNAインターカレート色素を含む LightCycler HRM マスターミックス (ロシュ社) を使用し、反応液量20 µlとしてPCR反応を進めた。

PCRサイクルの条件は以下の通りとした。

DNA変成：95℃、3分。

PCR サイクル：94℃、30秒 (DNA変成) / 57℃、30秒 (アニーリング) / 72℃、40秒 (DNA伸長) の条件で30回のサイクル後に72℃、40秒 (最終伸長)。

*国際医療センター 脳神経外科/脳脊髄腫瘍科

この後に融解曲線へのステップとして95℃ 1分, 50℃ 1分, 72℃ 5秒の後, 95℃へ向かって1℃につき30回連続して蛍光を取得した. ヒストンH3.3遺伝子に変異があると, 変異の無い野生型と比べて2本鎖DNAにミスマッチが生じてDNA融解温度が上昇した. この融解温度の違いをLightCycler480システムが図1のように解析してヒストンH3.3遺伝子変異の有無が検出された. 以上の高解像能融解曲線分析法にて遺伝子変異の存在が推定されるサンプルに対して, 引き続きABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Life Technologies) を用いて直接シーケンス法を行い,

変異の部位と種類を同定した.

結果

LGG例では本遺伝子変異はみられなかった. 3例のHGGにおいてコドン27でのAAG(K) → ATG(M)変異がみられた(表2). これらの3例は摘出術後に照射, 化学療法を行ったが, 全て術後4ヵ月以内に播種再発し全経過7ヵ月以内に死亡した. この経過は, ヒストンH3.3遺伝子変異のみられないHGGと比して明らかに悪かった(表3, 図1).

表 1.

The primers designed to the target sequences of the *histone H3.3* gene

5'-TTGATTTTTCAATGCTGGTAGG -3'(sense)
5'-AAGAGAGAACTTTGTCCCATTTT -3'

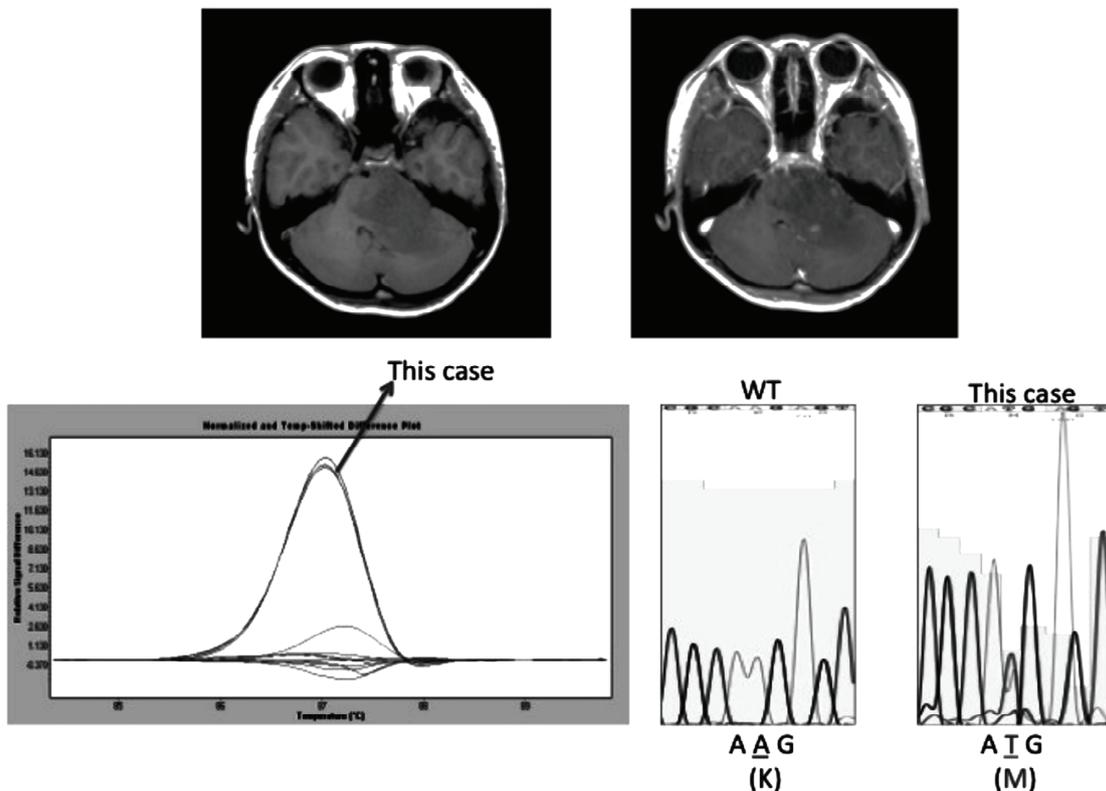


図 1. Anaplastic oligodendroglioma case with K27M mutation in *histone H3.3*. Upper panel show non-enhanced and enhanced axial T1-weighted magnetic resonance images in the left cerebellar hemisphere. The lower left panel shows the positive derivative of the melting curve allowing visualization of this case harboring K27M mutation, multiple curves are present because reactions were performed at least triplicate; the lower right panels show the DNA sequence trace of this tumor and the *histone H3.3* wild-type tumor.

表 2.

Summary of 33 glioma patients in this study

Glioma		Cases	Histone H3.3 mutation (+)
LGG	Pilocytic astrocytoma	6	0
	DIG	1	0
	Diffuse astrocytoma	1	0
	Oligodendroglioma	3	0
	Oligoastrocytoma	1	0
	Ependymoma	0	0
HGG	Anaplastic astrocytoma	3	0
	Anaplastic oligodendroglioma	2	1
	Anaplastic oligoastrocytoma	0	0
	Anaplastic ependymoma	8	0
	High-grade glioma	2	1
	GBM-O	1	0
	GBM	5	1
Total		33	3

DIG Desmoplastic infantile ganglioglioma; *GBM* Glioblastoma; *GBM-O* Glioblastoma with oligodendroglioma component

表 3.

Patient characteristics of newly diagnosed AO, HGG and GBM in our series

Histology	age	Location	Treatment	Outcome	PFS (M)	OS (M)	Histone H3.3
High-grade glioma	1Y	Lt. Temporal	Op, Chem	Alive	9	16	WT
High-grade glioma	9M	Rt. Parietal	Op, RT, Chem	Dissemination → Dead	4	7	K27M
Anaplastic oligodendroglioma	13Y	Lt. Frontal	Op, RT, Chem	Alive	21	49	WT
Anaplastic oligodendroglioma	8Y	Pons ~ Lt. cerebellum	Op, RT	Dissemination → Dead	6	6	K27M
GBM	24Y	Bit. Frontal	Op, RT, Chem	Alive	44	44	WT
GBM	17Y	Rt. Frontal	Op, RT, Chem	Alive	23	23	WT
GBM	11Y	Rt. Thalamus	Op, RT, Chem	Dissemination → Dead	5	7	K27M

PFS Progression free survival; *OS* Overall survival; *WT* Wild-type; *Op* Operation; *RT* Radiation Therapy; *Chem* Chemotherapy

考 察

ヒストンH3.3遺伝子変異が見られたグリオーマは全てHGGであり、この遺伝子異常は小児～若年グリオーマの進展に関与するものと思われた。また、変異を有する腫瘍は予後不良で、本遺伝子変異が小児～若年グリオーマの予後因子としての意義を有する可能性が示唆された。

文 献

- 1) Tabatabai G, et al. Molecular diagnostics of gliomas: the clinical perspective. *Acta Neuropathol* 2010;120:585-92.
- 2) Paugh BS, et al. Integrated molecular genetic profiling of pediatric high-grade gliomas reveals key differences with the adult disease. *J Clin Oncol* 2010;28:3061-8.
- 3) Qu HQ, et al. Genome-wide profiling using single-nucleotide polymorphism arrays identifies novel chromosomal imbalances in pediatric glioblastomas. *Neuro-oncol* 2010;12:153-63.
- 4) Schwartzentruber J, et al. Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature* 2012;482:226-31.
- 5) Wu G, et al. Somatic histone H3 alterations in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas and non-brainstem glioblastomas. *Nat Genet* 2012;44:251-3.
- 6) Chi P, et al. Covalent histone modifications-miswritten, misinterpreted and mis-erased in human cancers. *Nature Rev Cancer* 2010;10:457-69.
- 7) Khuong-Quang DA, et al. K27M mutation in histone H3.3 defines clinically and biologically distinct subgroups of pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas. *Acta Neuropathol* 2012;124:439-47.

研究成果リスト

論文

- 1) Adachi J, Yanagisawa T, Suzuki T, Fukuoka K, Koga T, Shirahata M, Mishima K, Nishikawa R. IDH1 mutations with relevance to 1p/19q loss and MGMT methylation in 23 pediatric glioma patients. *J Cancer Res Ther* 2013;9:S30.
- 2) Adachi J, Yanagisawa Y, Suzuki T, Fukuoka K, Shirahata M, Mishima K, Nishikawa R. IDH1 mutations with relevance to 1p/19q loss and MGMT promoter methylation in pediatric glioma patients. *Childs Nerv Syst* 2013;9(29):1758.

- 3) Suzuki T, Wada S, Eguchi H, Adachi J, Mishima K, Matsutani M, Nishikawa R, Nishiyama M. Cadherin 13 overexpression as an important factor related to the absence of tumor fluorescence in 5-aminolevulinic acid-guided resection of glioma. *J Neurosurg* 2013;119(5):1331-9.
- 4) Aoki K, Nishikawa R, Sugiyama K, Nonoguchi N, Kawabata N, Mishima K, Adachi J, Kurisu K, Yamasaki F, Tominaga T, Kumabe T, Ueki K, Higuchi F, Yamamoto T, Ishikawa E, Takeshima H, Yamashita S, Arita K, Hirano H, Yamada S, Matsutani M. A multicenter Phase I/II study of the BCNU implant (Gliadel Wafer) for Japanese patients with malignant gliomas. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 2014;54:290-301.

学会発表

- 1) 安達淳一, 遠竹恭子, 三島一彦, 白畑充章, 鈴木智成, 柳澤隆昭, 福岡講平, 佐々木惇, 西川亮. 変異型IDH1遺伝子迅速解析のグリオーマ術中病理診断への応用, 第31回日本脳腫瘍病理学会, 2013年5月, 東京
- 2) Adachi J, Yanagisawa T, Suzuki T, Fukuoka K, Shirahata M, Mishima K and Nishikawa R. IDH1 mutations with relevance to 1p/19q loss and MGMT promoter methylation in pediatric glioma patients, 41st Annual Meeting of the International Society for Pediatric Neurosurgery, 2013. 9, Mainz, Germany
- 3) 安達淳一, 和田智, 鈴木智成, 福岡講平, 柳澤隆昭, 白畑充章, 三島一彦, 西川亮. ヒストンH3.3遺伝子変異を有する小児グリオーマの臨床像, 日本脳神経外科学会, 第72回学術総会, 2013年10月, 横浜
- 4) Adachi J, Totake K, Shirahata M, Mishima K, Suzuki T, Yanagisawa T, Nishikawa R. Application of rapid IDH1 gene mutation analysis for pathological diagnosis during glioma surgery, 4th Quadrennial Meeting of the World Federation of Neuro-Oncology, 2013. 11, San Francisco, USA
- 5) 安達淳一, 和田智, 鈴木智成, 福岡講平, 柳澤隆昭, 白畑充章, 三島一彦, 西川亮. ヒストンH3.3遺伝子変異を有する小児～若年者グリオーマ例の検討, 第31回日本脳腫瘍学会学術集会, 2013年12月, 宮崎

<特許出願>

なし

学内グラント 報告書

平成25年度 学内グラント終了時報告書

肝 LKB1 の糖尿病における役割

研究代表者 小野 啓 (大学病院 内分泌内科・糖尿病内科)

研究分担者 住田 崇*, 鈴木 徳子*

背景

LKB1はPeutz-Jeghers症候群の原因遺伝子であり、エネルギー欠乏状態で活性化されるAMPK (AMP活性化プロテインキナーゼ) をリン酸化して活性化する酵素としても知られている¹⁾。2005年にReuben Shawらは成熟マウスの肝臓のLKB1をCre-LoxPシステムを用いて急性に減少させると空腹時血糖が上昇し糖尿病を発症すること、および糖尿病治療薬メトフォルミンがLKB1-AMPK経路を介して血糖低下作用を発揮していることをScience誌に発表した²⁾。筆者らはAMPKの競合阻害型変異体を肝臓に急性に発現させると空腹時血糖が上昇することを発表している³⁾。これらのことから、肝臓においてLKB1-AMPK経路を遮断すると糖尿病を発症することが示されたということが言える。しかし逆に、糖尿病においてLKB1-AMPK経路がその病態生理に関与しているかどうかは不明である。

目的

糖尿病モデルにおいて肝臓のLKB1がその病態に関与しているかどうかを調査する。

方法の概要

マウスの糖尿病モデルにおいて肝臓のLKB1がどのように変化しているかを検索する。そして、肝臓のLKB1を増加させたときに糖尿病が改善するかどうかを調査する。

方法と結果

重症の糖尿病モデルであるdb/dbマウスの肝臓におけるLKB1の定量を蛋白レベル、mRNAレベルの両方で行い、非糖尿病マウスのモデルとして汎用されているC57Bl/6マウスのそれと比較を行ったところ、

db/dbマウスの肝臓ではLKB1の量が著明に減少していた(タンパク質量; C57Bl/6/J: 1.0 ± 0.2 vs. db/db: 0.1 ± 0.0 , mRNA量; 1.0 ± 0.1 vs. 0.4 ± 0.0 ; 図1)。これに対し、インスリン抵抗性モデルである1日あるいは2週間の高脂肪食を摂取したC57Bl/6マウスの肝臓においては、LKB1の量は通常食の同種マウスと有意差を認めなかった。糖尿病の治療によって肝LKB1の量が変化するかどうかを調べるため、db/dbマウスを19日間にわたりinsulin glargineの1日1回投与により高血糖を是正した後に肝LKB1を定量したところ、LKB1の増加が認められた(図1)。

次に、db/dbマウスの肝LKB1を強制発現させ、糖尿病にどのような影響を及ぼすのかを調べた。db/dbマウスの尾静脈よりLKB1もしくはLacZのベクターを投与して、肝臓でこれらのタンパク質を強制発現させることで、糖代謝、インスリン伝達経路、遺伝子発現を解析した。

ベクター投与により、肝臓のLKB1は内因性に比して著明に増加した(図2)。

ベクター投与5日後のマウスを5時間絶食させた時の空腹時血糖はLKB1を強制発現させた群が有意に低下していた(LacZ: 521 ± 59 mg/dL 対 LKB1: 304 ± 21) が、インスリン負荷後の血糖値には有意差を認めなかった(図3)。グルコース負荷試験はLKB1群でグルコース負荷後30分、60分、90分の血糖値が有意に低かった(負荷後15分 LacZ: 427 ± 19 mg/dL vs. LKB1: 324 ± 35 , 60分 LacZ: 488 ± 23 vs. LKB1: 373 ± 45 , 90分 LacZ: 455 ± 31 vs. LKB1: 343 ± 49 ; 図4)。肝臓のシグナル伝達を調べたところ、AMPKのリン酸化には有意な変化は認められなかったが、インスリン刺激時のS6キナーゼのリン酸化が亢進していた(図5)。ベクター投与11日後の体重は両群間に差はなかったが(LacZ: 39.3 ± 0.7 g vs. LKB1: 39.7 ± 0.6)、体重当たりに占める肝臓の割合を調べたところ、LKB1群の方が有意に大きかった(LacZ: $5.3 \pm 0.2\%$ vs. LKB1: 8.9 ± 0.6)。脂肪

*大学病院 内分泌内科・糖尿病内科

は変化を認めなかった (LacZ: $5.1 \pm 0.1\%$ vs. LKB1: 5.1 ± 0.1) (図6). また, 糖新生の律速酵素である PEPCK, G6Pase, PGC1 α の mRNA 量が LKB1 群で有意に減少しており (それぞれ 0.5 倍, 0.8 倍, 0.5 倍; 図7), これと対照的に, 解糖系の律速酵素である GCK, PFK

は LKB1 群で有意に増加していた (それぞれ 1.7 倍, 1.2 倍; 図8). PK は LKB1 群で増加傾向であった (1.3 倍). LKB1 群の肝臓の外観が白色を呈しており, また肝臓重量が大きかったため, FAS の mRNA 量を調べたところ LKB1 群で有意に増加していた (2.0 倍; 図9).

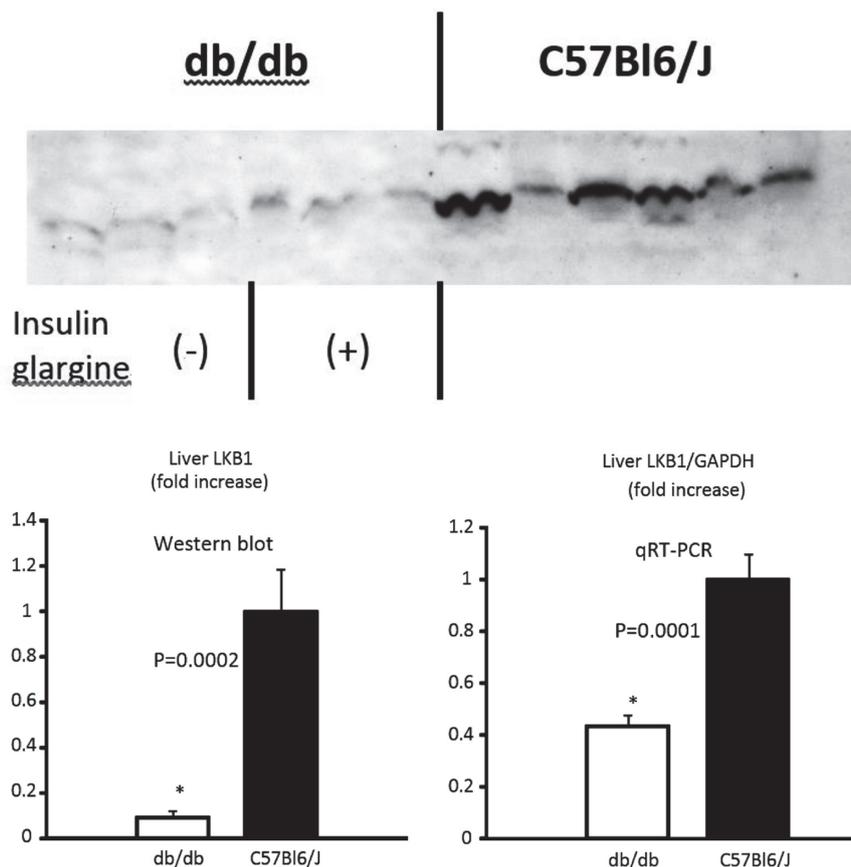


図 1. マウス肝臓のLKB1はdb/dbマウスにおいて減少しており, インスリンによる治療により部分的に改善した.

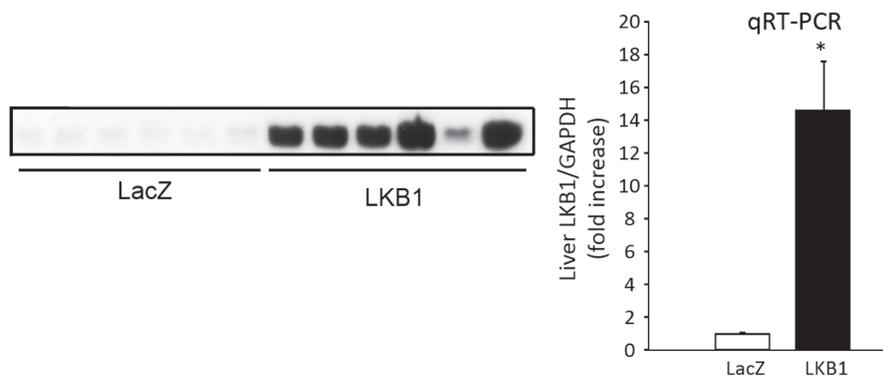


図 2. ベクターの静脈注射により肝臓にLKB1が効果的に強制発現された.

次に、軽症のインスリン抵抗性モデルである、1日の高脂肪食を摂餌したC57Bl6マウスにおいて、肝臓のLKB1の強制過剰発現が糖代謝にどのように影響するかを、無麻酔非拘束条件下での高インスリン血症正常血糖クランプ法を用いて解析した。クランプは60%脂質からなる高脂肪食を1日摂餌したマウスを3時間絶食させ、その後に2時間のbasal periodにて空腹時の基礎糖産生量を測定し、次いで2.5 mU/kg/minの生理的高インスリン血症条件下で正常血糖を保つためのグルコース注入量(GIR)、末梢組織への糖取り込み量(Rd)、内因性糖産生量(EGP)および糖産生量の基礎糖産生量に比較した抑制率(SupGP)を測定した。

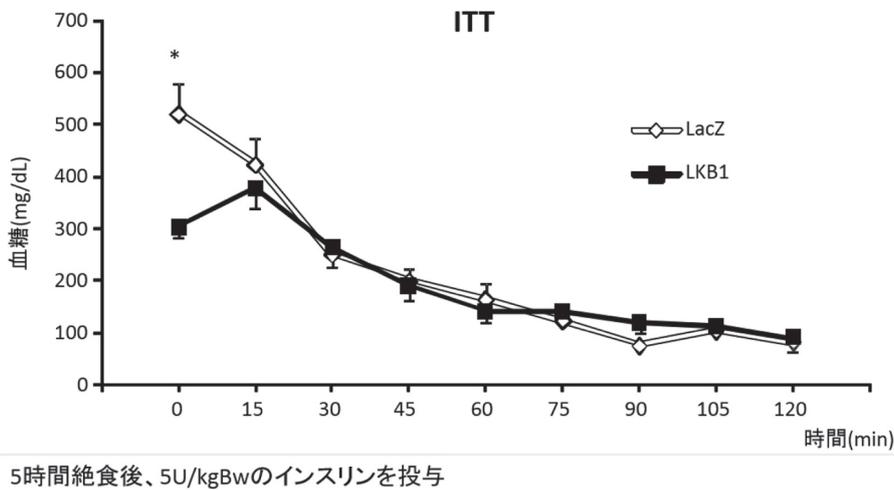
このモデルにおいては、空腹時血糖(FPG)は両群で有意差を認めなかった(図11)。予想に反して、内

因性の基礎糖産生量はLKB1群で有意に増加しており(図11, basal EGP)、インスリン持続注入時の糖産生量もコントロールと比較して有意に高値であった。グルコース注入量および糖取り込み量には群間に有意差は認められなかった(図11)。

考察

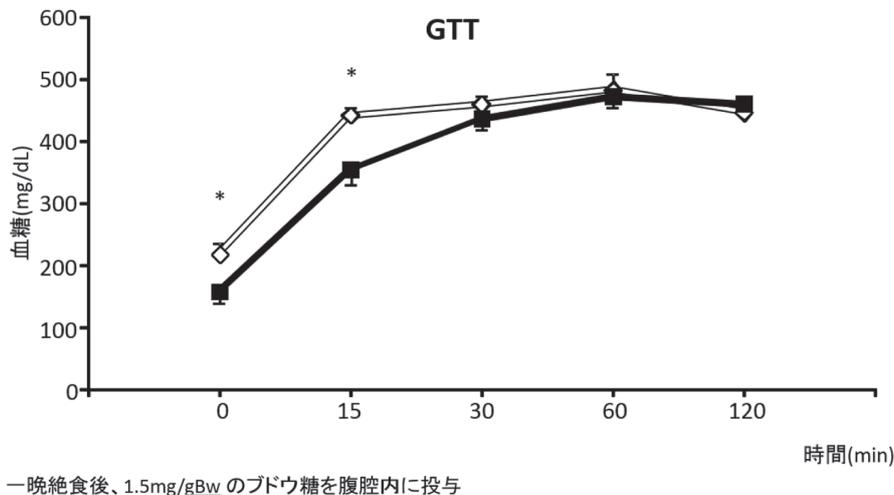
重症の糖尿病モデルであるdb/dbマウスの肝臓においてはLKB1のダウンレギュレーションがインスリン抵抗性に関与している可能性が示唆された。

このdb/dbマウスにおいて、減少しているマウスの肝LKB1を急性に補充すると、空腹時血糖、耐糖能が改善したが、これは2005年のShawらの報告と合致する。db/dbマウスで減少している肝LKB1を強制的



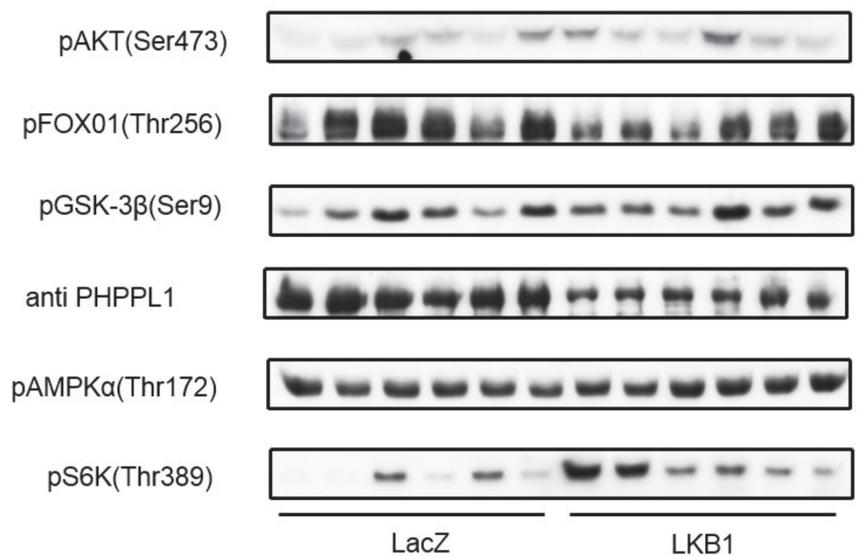
5時間絶食後、5U/kgBwのインスリンを投与

図3. インスリン負荷試験では、5時間空腹後の血糖値の有意な低下を認めたが、インスリン負荷後の血糖値には有意差がなかった。



一晩絶食後、1.5mg/gBwのブドウ糖を腹腔内に投与

図4. 糖負荷試験において、LKB1群では空腹時、負荷15分後の血糖値は有意に低値であったが、その後はコントロール群と有意差が認められなかった。



5時間絶食後の全てのマウスに1U/kgBwのインスリンを腹腔内投与し、投与1分後に肝臓を摘出した

図 5. 肝臓のシグナル伝達.

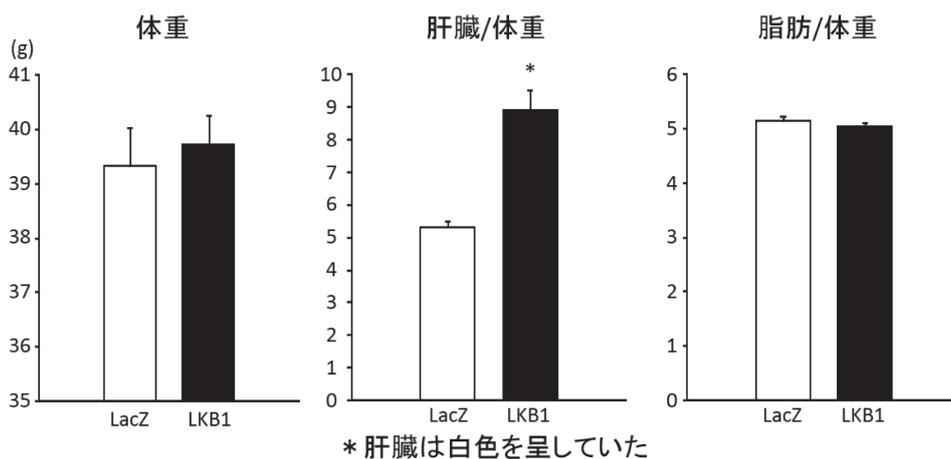


図 6. LKB1の強制発現は肝腫大と白色肝を呈した.

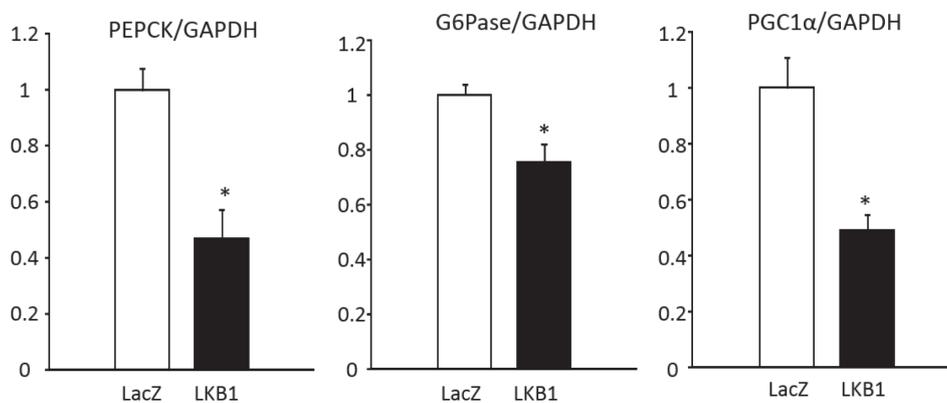


図 7. 肝臓の糖新生律速酵素と関連因子への影響.

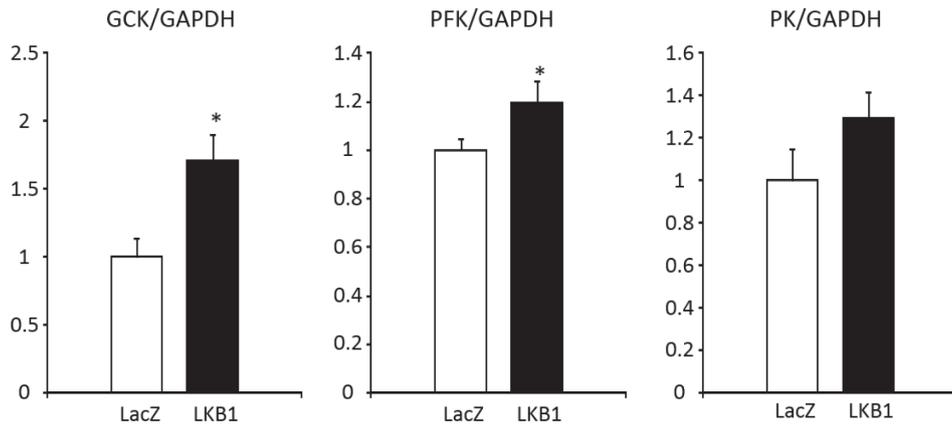


図 8. 解糖系律速酵素への影響.

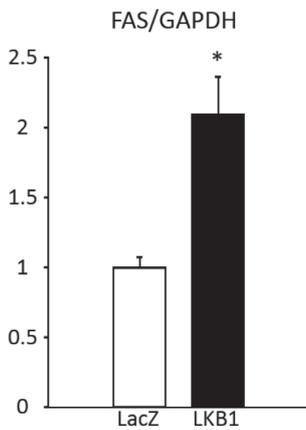


図 9. 肝臓の脂肪酸合成酵素 (FAS) は LKB1 群で増加していた.

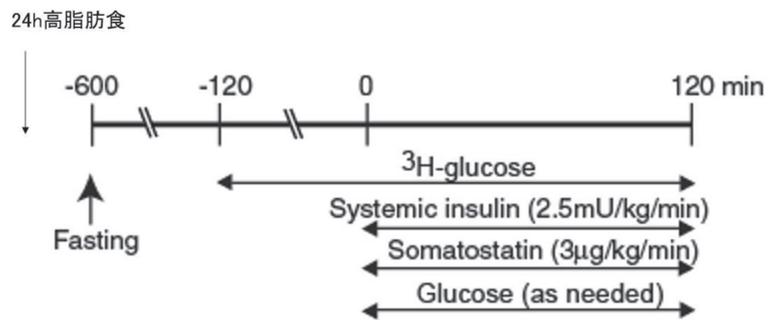


図 10. 1日高脂肪食負荷マウスにおけるインスリンクランプのプロトコール.

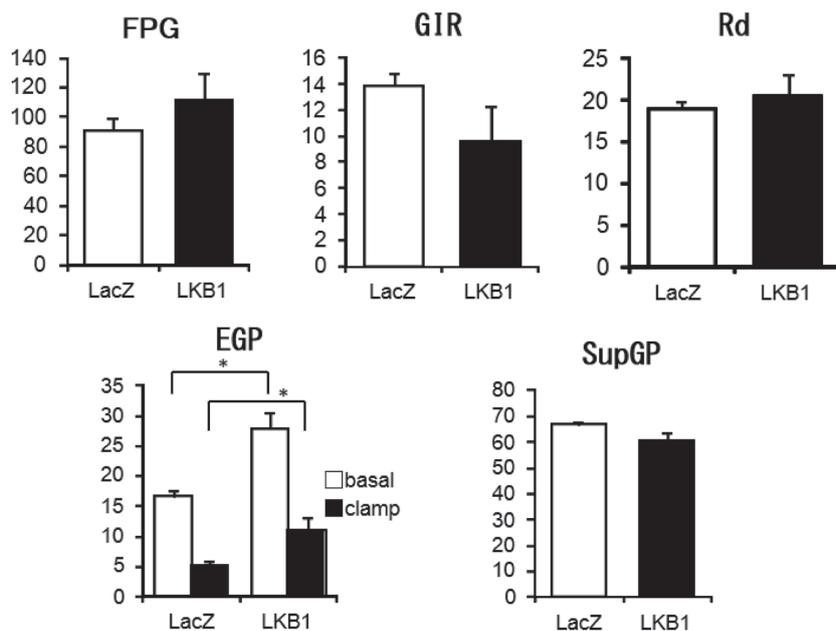


図 11. 1日高脂肪食負荷マウスにおけるインスリンクランプの結果.

に増加させると、糖新生の律速酵素であるPEPCK, G6Pase, PGC1 α が抑制され、さらに解糖系を調節しているGCK, PFK, PKが活性化されることで、糖新生抑制と解糖系亢進が起こり、血糖の低下作用を来すことが示唆された。

AMPKのリン酸化はLKB1の強制発現で有意な変化を認めなかったため、減少している肝LKB1を補充することで現れた血糖値が低下にはLKB1-AMPKを介さない別の経路が関与していることが示唆された。

肝LKB1を補充すると白色の肝腫大を認め、肝脂肪合成の律速酵素であるFASが増加しており、肝臓の脂肪合成にもLKB1が関与している可能性が考えられた。

肝臓のLKB1の低下が見られないインスリン抵抗性モデルである短期高脂肪食マウスにおいては、肝臓へのLKB1の過剰発現はインスリン抵抗性を改善しなかった。

結 語

重症糖尿病モデルであるdb/dbマウスにおいて肝臓のLKB1の減少が高血糖に関与しており、これをレスキューすることによって糖尿病を改善できる可能性が示された。

参考文献

- 1) Imai K, Inukai K, Ikegami Y, Awata T & Katayama S. LKB1, an upstream AMPK kinase, regulates glucose and lipid metabolism in cultured liver and muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;351:595-601.

- 2) Shaw R J, et al. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science* 2005;310:1642-6.
- 3) Viana AY, et al. Role of hepatic AMPK activation in glucose metabolism and dexamethasone-induced regulation of AMPK expression. *Diabetes Res Clin Pract* 2006;73:135-42.

研究成果リスト

学会発表

- 1) Sumita T, Ono H, et al. Role of Hepatic LKB1 in the pathophysiology of diabetes in obese diabetic mouse, FASEB summer research conference, AMPK: Central Regulatory System in Metabolism & Growth, 2010年10月4日, 滋賀県 大津プリンスホテル
- 2) 住田崇, 小野啓, 他. 肥満糖尿病マウスにおける肝LKB1の役割, 第27回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会, 2013年2月23日, 東京 JA共済ビル
- 3) 住田崇, 小野啓, 他. 肥満糖尿病マウスにおける肝LKB1の役割, 第56回日本糖尿病学会年次学術集会, 2013年5月18日, 熊本 メルパルク熊本

論文

- 1) Sumita T, Ono H, et. al. Mediobasal hypothalamic PTEN modulates hepatic insulin resistance independently of food intake in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2014;307(1):E47-60.

学内グラント 報告書

平成25年度 学内グラント終了時報告書

骨髄由来樹状細胞の腫瘍細胞死貪食を利用した
小児神経芽腫の新しい細胞治療の開発

研究代表者 井上 成一郎 (総合医療センター 肝胆膵外科・小児外科)

緒言

従来悪性腫瘍に対する抗がん化学療法は患者自体の免疫防御機構を抑制するため腫瘍免疫学的観点からは不利と考えられていた。しかし、ある種の腫瘍に対し特定の抗悪性腫瘍薬が作用すると免疫学的に有利な効果を誘導する現象が知られるようになった。近年その現象の効果やメカニズムの詳細が徐々に解明されつつありchemoimmunotherapyとして注目されている^{1,2)}。

抗がん化学療法により誘導される免疫修飾効果は、腫瘍細胞に対する効果と宿主の免疫機構への効果の2種に大別できる。まず腫瘍細胞に対する作用を介して機能するメカニズムとして、腫瘍細胞表面への腫瘍抗原発現の促進、Co-stimulatory moleculesの細胞表面での発現促進、免疫寛容を誘導する細胞表面分子(Immune checkpoint molecules; B7-H1/PD-L1やB7-H4等)の発現抑制、CD8陽性リンパ球による腫瘍細胞溶解効果に対する感受性の促進の報告がある。これらの効果は、悪性腫瘍の種類(病理組織学的差異や生物学的特異性)と使用する薬剤の種類に依存している。また宿主の免疫機構に対する作用のメカニズムとして、調節性リンパ球(Regulatory T cell)の誘導または機能抑制を介して腫瘍細胞の寛容機構を調節する経路、helper Tリンパ球による免疫反応の惹起、Myeloid-derived suppressor cells(MDSC)の誘導または抑制作用とこれを介したCD8⁺T cellのexpansionの促進、樹状細胞(Dendritic cell: DC)の機能の促進が報告されている(図1)。これらの効果は抗悪性腫瘍薬の量および投与のタイミングが重要で、特にワクチン療法との併用では重要な要因となると考えられている。これらの報告のほとんどが前立腺がん、乳がん、大腸がん、非小細胞性肺がんや悪性黒色腫などでの試みが多く進行神経芽腫に関する報告は非常に少ない¹⁾。

小児固形腫瘍は集学的治療の発達により短期生存

率は明らかに改善したものの、寛解後の再発や治療の部分的効果しか得られず最終的には死亡に至る例もいまだ後を絶たない。さらに、完治できる場合でも治療後の長い人生をおくる小児の場合、治療後遺症や新たな発癌の問題等克服すべき多くの問題が残存しており、より効果的で、より負担の軽度な質の高い治療法が開発が望まれる³⁾。自己の免疫機構の有効利用が重篤な副作用を軽減し、より高い効果を得ることに繋がる。従来の集学的治療を基礎に免疫学的知見を取り入れた新しい治療法が開発が期待される。

我々はこれまでにchemoimmunotherapyのconceptに着目し、各種抗がん剤特にdoxorubicinがマウス神経芽腫細胞にApoptosisを誘導することを確認した⁴⁾。さらに、この死細胞を抗原提示細胞が貪食するとCD8⁺リンパ球の分裂増殖反応がより誘導されるかを評価^{5,6)}した。さらにdoxorubicinのchemoimmunotherapyによる効果を応用し、自己の免疫細胞を用いたcell therapyと融合させることで低侵襲かつ効果の高い新しい治療法を開発を試みた。Immunogenic cell deathを誘導した神経芽腫細胞が樹状細胞を中心とした貪食細胞に貪食され免疫反応を誘導するメカニズムを解析し、神経芽腫細胞治療効果の高い貪食細胞の作製と、この細胞を用いた新しい治療プロトコルの開発を目指した。

材料と方法

・マウス神経芽腫細胞株

マウス由来神経芽細胞腫細胞株neuro-2a(ATCCTM/住商ファーマインターナショナル)を、10%FBS(ATCCTM)、1%Penicillin-Streptomycin(GIBCOTM)を添加したMinimum Essential Medium Eagle(ATCCTM)中で37.0℃・5%CO₂下で培養した。培養dishに接着したneuro-2a細胞はTrypsin(0.25%)・EDTA(1mmol)(和光純薬)を添加して遊離し細胞懸濁液とした。

・実験動物

8～12週齢雌A/J mouse (日本SLC) を埼玉医科大学総合医療センター研究部動物実験施設において固形飼料および水を自由に摂取できる状況下で飼育管理を行い実験に使用した。

・薬剤および各種抗腫瘍薬による細胞死誘導

Doxorubicin hydrochloride (Sigma-Aldrich), Cisplatin: CDDP (シスプラチン注) [マルコ]^R (ヤクルト) を用いて先に我々が報告した方法⁴⁾を用いて細胞死を誘導した。

・骨髄由来樹状細胞 (Bone marrow-derived dendritic cell) の誘導

マウス骨髄由来樹状細胞 (Bone marrow-derived dendritic cell) は先に報告した方法を用いて骨髄細胞から培養系で誘導した (癌と化学療法)。マウス両側大腿骨・腓骨を採取, RPMI1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA) で骨髄を洗浄した後赤血球溶血して骨髄細胞浮遊液を作成した。細胞浮遊液を20 ng/ml recombinant GM-CSF (R and D Systems, Inc. Minneapolis, MN) を添加したRPMI 1640で37℃, 5% CO₂下で培養した。培養開始後7日目にTrypsin (0.25%) -EDTA(1 mmol) を用いて接着性細胞を回収した。マウス細胞表面

抗原CD11c及びMHC class IIの発現をFACSVerse flow cytometer (BD, Franklin Lakes, NJ) で確認した。

・リンパ球混合培養におけるCD8 α^+ リンパ球増殖反応の誘導効果の確認

リンパ球混合培養におけるResponderとしてマウス脾臓及び腸間膜リンパ節からCD8 α 陽性リンパ球を分離した⁶⁾。マウス脾臓・腸間膜リンパ節を用いMACS running buffer (Miltenyi Biotec GmbH) で細胞浮遊液とした。得られた細胞はanti-mouse CD8 α^+ magnetic beads (Miltenyi Biotec) を加え4℃で15分間incubateし, Auto MACS Pro separator (Miltenyi Biotec) を用いてCD8 α^+ 細胞を単離し混合培養に使用した。

細胞死が誘導された腫瘍細胞がDM-DCに貪食され抗原提示される際に引き起こされる抗腫瘍免疫反応を, リンパ球の増殖反応及びIFN- γ 産生を指標に評価した。単離したCD8 α^+ リンパ球を10 mMのCFSE (Enzo Life Science) で染色した後, RPMI 1620 medium (和光純薬) に懸濁した。hamster anti-mouse CD3/CD28 antibody (BD Pharmingen) でcoatingしたFlat bottom 24 well Plateにリンパ球, BM-DC, 細胞死を誘導したneuro-2a細胞を加え混合培養した。37℃, 5% CO₂下で培養し, リンパ球の分裂増殖による

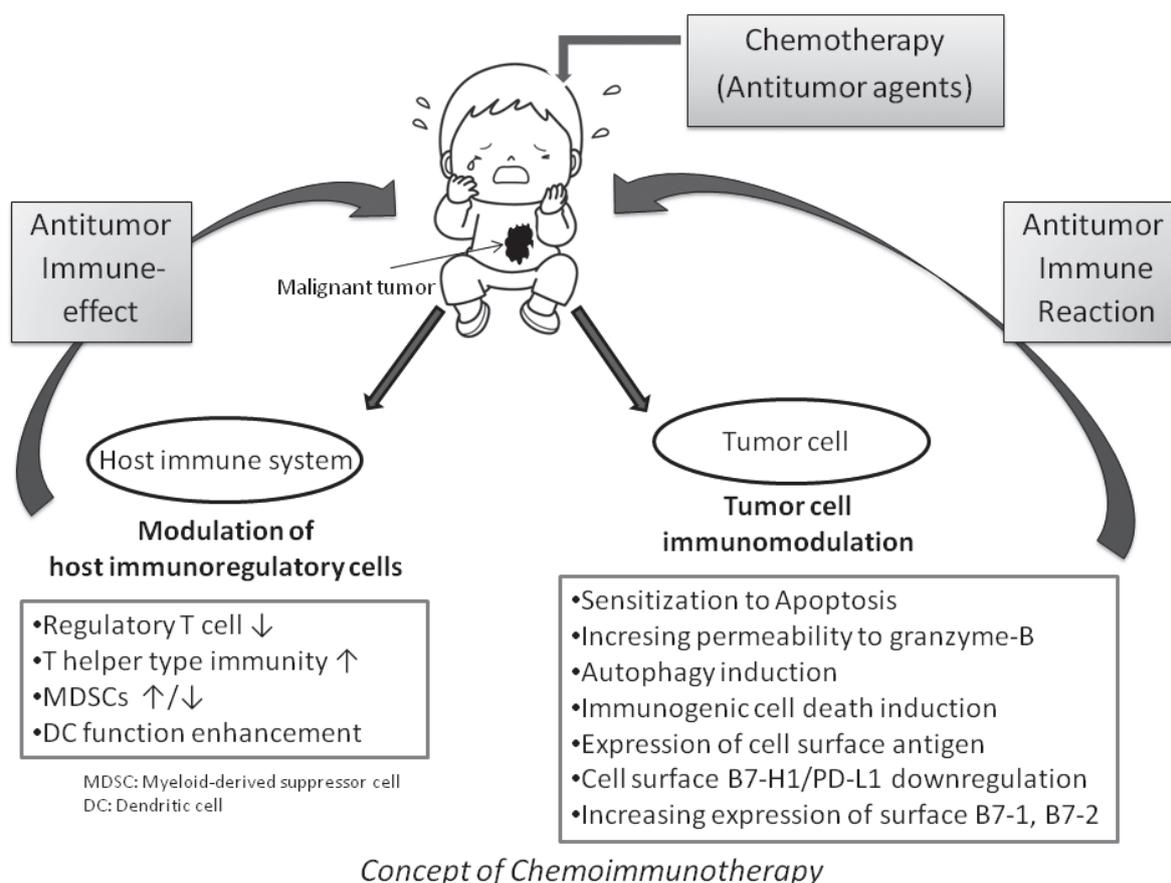


図1. 悪性腫瘍に対する免疫学的効果に着目した化学療法-Chemoimmunotherapyのconcept-

CFSE 輝度の減弱をFACSで確認した。さらに混合培養中のIFN- γ 濃度をmouse IFN- γ kit (BD Biosciences)を用いてELISA法で測定した。

・抗腫瘍効果を増幅させた骨髓由来樹状細胞 (Bone marrow-derived dendritic cell) の誘導と抗原提示能の評価

上記方法にてマウス骨髓より誘導したBM-DC培養系に doxorubicin で細胞死を誘導した neuro-2a 細胞を添加した。AdjuvantとしてToll-like receptor (TLR) -4 agonistであるlipopolysaccharide (LPS) (100 ng/ml; Sigma-Aldrich) を添加した。得られた細胞におけるCD11c⁺ MHC class II⁺ double positive cellの誘導効率をFACSで評価した。さらにこの細胞を抗原提示細胞としてCD8 α ⁺リンパ球, UV照射したneuro-2a細胞とともにリンパ球混合培養を施行し, リンパ球増殖反応を確認しIFN- γ 産生を評価した(図3)。

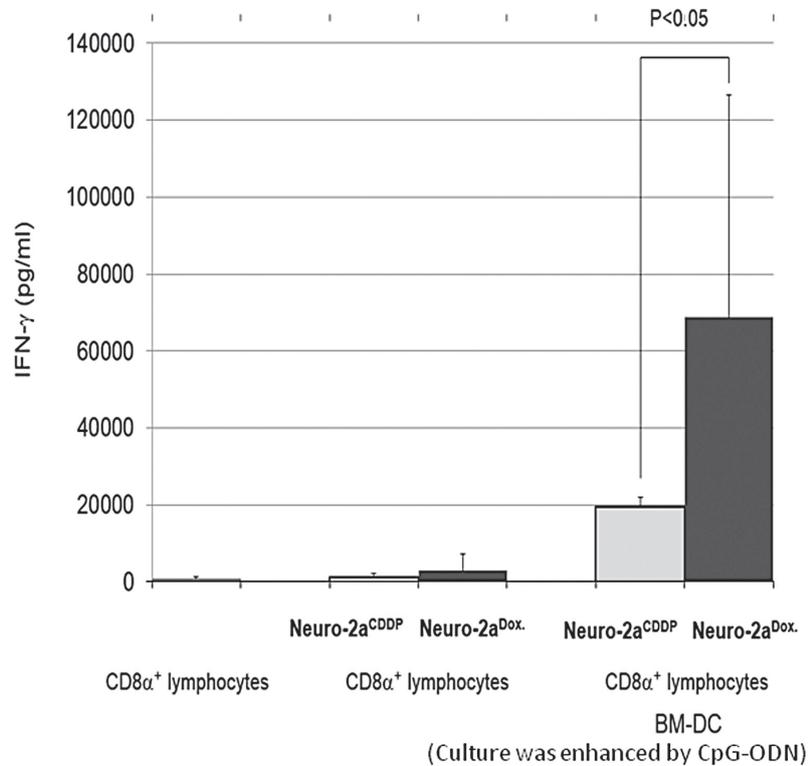
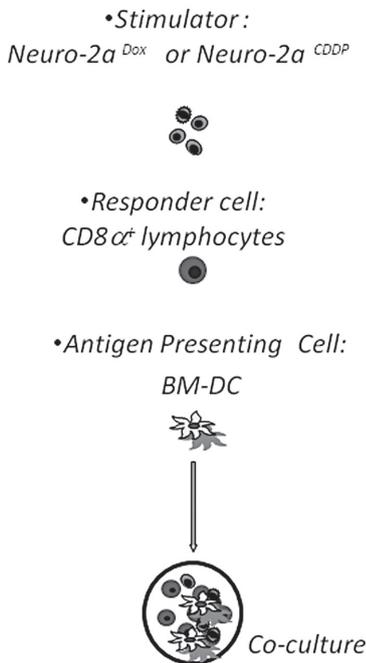
結果

細胞死を誘導したneuro-2aとともにBM-DC及びCD8 α ⁺リンパ球を混合培養すると, リンパ球増殖反応が誘導された。細胞死を誘導する薬剤として doxorubicinを用いると, CDDPを用いた場合に比べ

混合培養にてよりIFN- γ 産生が強く誘導された。従来から他の癌腫で報告されていた結果と同様マウス神経芽腫細胞においても doxorubicinはimmunogenic cell deathを誘導することが判明した(図3)⁵⁾。

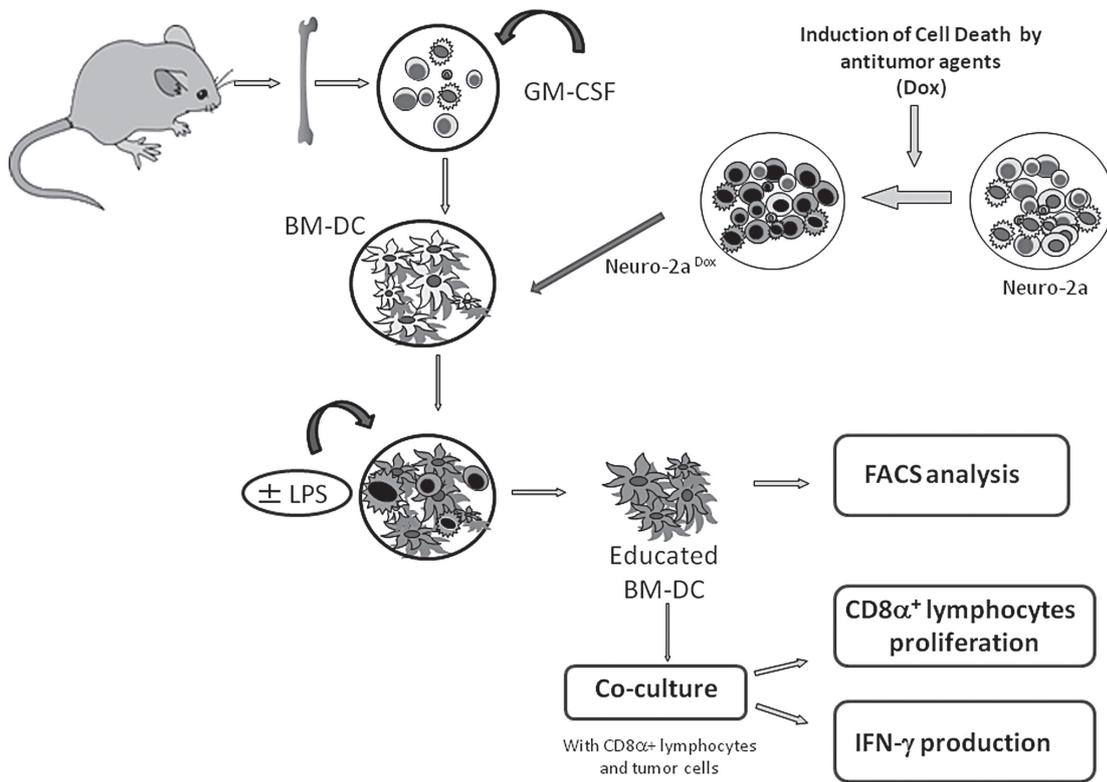
細胞培養系で doxorubicin を作用させて immunogenic cell deathを誘導したneuro-2a細胞とともに, マウス骨髓細胞から誘導したBM-DCを適切な adjuvantとしてTLR agonistを添加することでBM-DC細胞表面にMHC class II moleculeを発現し, CD11c⁺ MHC class II⁺ double positive cellを誘導できることが判明した(図4)。

さらにこのCD11c⁺ MHC class II⁺ double positive cellを多数含むBM-DCをantigen presenting cellとし, UV照射で増殖能を抑えたneuro-2a細胞をstimulator, CD8 α ⁺リンパ球をresponderとして混合培養すると, このCD11c⁺ MHC class II⁺ double positive cellを多数含むBM-DCをantigen presenting cellとして培養した際に最も強くIFN- γ 産生を誘導することができた(図5)。Doxorubicinを培養系で貪食させ, より腫瘍細胞に対するリンパ球増殖を誘導するDCへの分化を“educate”した。本稿ではこの細胞を“Educated BM-DC”とした。



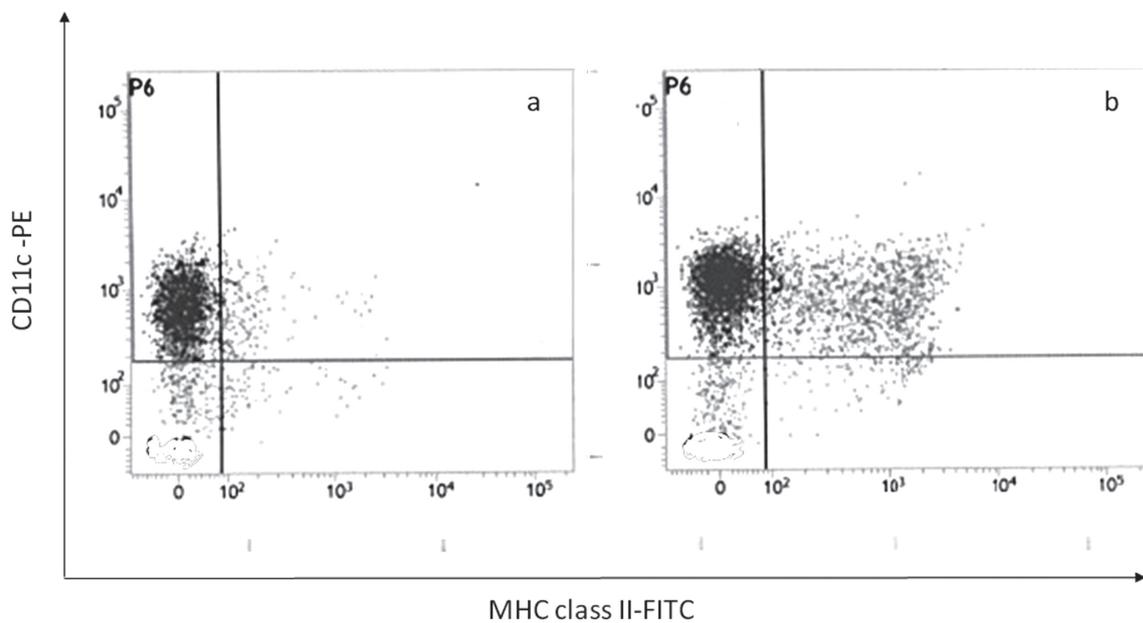
Evaluation of the ability to induce immunogenic cell death by doxorubicin treatment (compared with CDDP). (Inoue et al. Exp Ther Med. 2014より 一部改)

図2. Immunogenic cell death 誘導効果：DoxorubicinとCDDPの比較 (Inoue, et al. Exp Ther Med. 2014 より。一部改編し引用)。



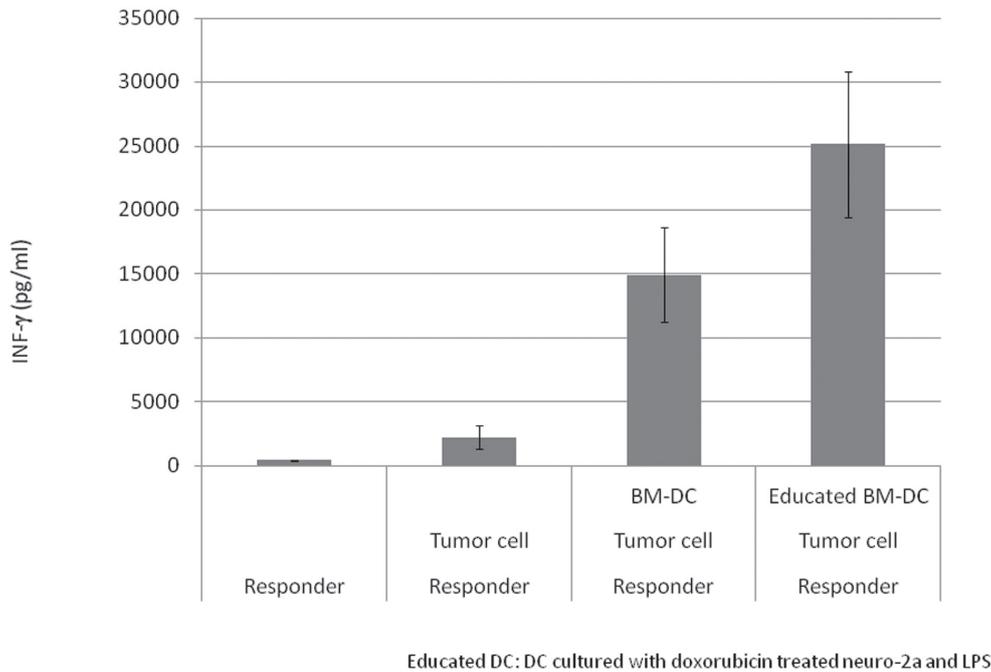
Establishment of Educated BM-DC from mouse Bone Marrow Cell

図 3. Educated DC作成と効果判定 (Schema).



Typical pattern of MHC Class II molecule expression on the surface of CD11c⁺ BM-DC

図 4. Educated DCにおけるMHC class II分子の細胞表面発現.



IFN-γ production in co-culture using Educated BM-DC

図 5. Educated DCによる腫瘍免疫反応誘導効果 (in vitroでの検討).

考 察

小児神経芽腫において腫瘍抗原を用いて自己のDCによる抗原提示を誘導するいわゆる腫瘍ワクチン療法が臨床試験や動物を用いた実験の報告があるが⁷⁻⁹⁾ 広く臨床に普及するまでの効果は得られていない。一方、進行神経芽腫の遠隔転移や、寛解導入後原発巣における局所コントロールがなされているにも関わらず遠隔再発に苦しむ患児における腫瘍進展メカニズムにcirculation tumor cellの存在に注目が向けられており、その生物学的特性が原発巣と再発腫瘍で異なる可能性が指摘されている^{10,11)}。腫瘍の免疫学的特性も治療経過や投与薬剤に影響を受ける可能性がある。従来の2年生存率を改善させた外科手術、抗癌化学療法、放射線療法を組み合わせた集学的治療をさらに改善し、QOL改善も含めた患児の長期治療成績向上には化学療法における神経芽腫の腫瘍免疫学的知見の解明とその知見に立脚した新しい治療法の開発が不可欠である。Chemoimmunotherapyの観点から神経芽腫治療を検討することは遠隔転移や再発などの進行神経芽腫の予後に大きな影響を与える病態に対する新しい治療の開発に寄与する可能性がある。

我々は他癌種で報告されていた通り、doxorubicinは神経芽腫細胞にimmunogenic cell deathを誘導することを報告し(図2)⁵⁾ 神経芽腫においても

chemoimmunotherapyに立脚した新しい治療法の開発が可能であることを確認した。さらにimmunogenic cell deathを誘導した神経芽腫細胞を貪食し抗原提示する際に、CD11b⁺脾細胞(macrophageを主体とする)と想定)と比較し骨髓細胞をGM-CSFを添加して培養することで得られたCD11c⁺細胞(BM-DC主体とする)がよりCD8α⁺リンパ球増殖とIFN-γ産生を誘導することを確認した。BM-DCを死細胞と混合培養し適切なToll Like Receptor刺激を添加することでこのBM-DCがより免疫反応を誘導する細胞へと分化できるかを評価した(図3)。DCには抗原細胞を貪食すると抗原提示を介して免疫応答を誘導するものと、免疫寛容を誘導するものがあり、特に未熟なDCほど免疫寛容を誘導しやすく、分化が進むほど拒絶を誘導することが知られている。図5に示したようにdoxorubicin処理したneuro-2a細胞とLPSを用いて“educate”したBM-DCはその後の混合培養でCD8α⁺リンパ球によるIFN-γ産生を促進する効果を示した。このeducated BM-DCをFACS解析するとよりMHC class II分子が細胞表面に発現しており(図4)より分化した状態にあると考えられた。この点も今後腫瘍免疫を誘導するメカニズムの解析の一環として分析を進める方針である。さらに、これらの結果をもとに、より免疫反応を誘導しやすいBM-DCをex-vivoで作成し、最終的にこの細胞を用いたcell therapyの開発と、化学療法と

cell therapyを組み合わせた新しい治療プロトコールの確立を目指して今後も研究を展開していきたいと考えている。

最後に本実験を遂行するにあたり平成25年度埼玉医科大学学内グラントが多大な援助となったことをここにご報告し、採択頂いたことを感謝申し上げます。

謝 辞

本研究施行にあたり細胞培養・維持並びに培養細胞実験、FACS解析実験の技術的協力を頂きました総合医療センター研究部共同利用研究施設担当瀬戸山由美子様に深く感謝申し上げます。

引用文献

- 1) Emens LA. Chemoimmunotherapy. *Cancer J* 2010;16(4):295-303.
- 2) Chen G, Emens LA. Chemoimmunotherapy: reengineering tumor immunity. *Cancer immunol immunother* CII 2013;62(2):203-16.
- 3) Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL. Neuroblastoma. *Lancet* 2007;369(9579):2106-20.
- 4) 井上成一朗. 神経芽腫マウスモデルを用いた自然免疫細胞による腫瘍死細胞除去と免疫応答の検討. *埼玉医科大学雑誌* 2010;37(1):46-50.
- 5) Inoue S, Setoyama Y, Odaka A. Doxorubicin treatment induces tumor cell death followed by immunomodulation in a murine neuroblastoma model. *Exp Ther Med* 2014;7(3):703-8.
- 6) 井上成一朗, 瀬戸山由美子, 小高昭雄. Chemoimmunotherapyに立脚した各種抗悪性腫瘍薬の神経芽腫細胞に対する効果. *癌と化学療法* 2014 (in press).
- 7) Geiger JD, Hutchinson RJ, Hohenkirk LF, et al. Vaccination of pediatric solid tumor patients with tumor lysate-pulsed dendritic cells can expand specific T cells and mediate tumor regression. *Cancer Res* 2001;61(23):8513-9.

- 8) Ohashi K, Kobayashi G, Fang S, et al. Surgical excision combined with autologous whole tumor cell vaccination is an effective therapy for murine neuroblastoma. *J Pediatr Surg* 2006;41(8):1361-8.
- 9) Shilyansky J, Jacobs P, Doffek K, Sugg SL. Induction of cytolytic T lymphocytes against pediatric solid tumors in vitro using autologous dendritic cells pulsed with necrotic primary tumor. *J Pediatr Surg* 2007;42(1):54-61.
- 10) Kuroda T, Honna T, Morikawa N, et al. Tumor cell dynamics and metastasis in advanced neuroblastoma. *Pediatr Surg Int* 2005;21(11):859-63.
- 11) Kuroda T. Cellular kinetics of neuroblastoma and the role of surgery. *Pediatr Surg Int* 2011;27(9):913-7.

研究成果

研究論文

- 1) Inoue S, Setoyama Y, Odaka A. Doxorubicin treatment induces tumor cell death followed by immunomodulation in a murine neuroblastoma model. *Exp Ther Med* 2014 Mar;7(3):703-8.
- 2) Inoue S, Setoyama Y, Odaka A. Phagocytosis of bafilomycin A1 treated apoptotic neuroblastoma cells by bone marrow-derived dendritic cells initiates a CD8 α^+ lymphocyte response to neuroblastoma. *J Pediatr Hematol Oncol* 2014 July;36(5):e290-5.
- 3) 井上成一朗, 瀬戸山由美子, 小高昭雄. Chemoimmunotherapyに立脚した各種抗悪性腫瘍薬の神経芽腫細胞に対する効果. *癌と化学療法* 2014 May;41(5):617-21.

学会発表

- 1) 井上成一朗, 小高昭雄, 瀬戸山由美子, 別宮好文. マウス神経芽腫に対するChemoimmunotherapyの可能性-DoxorubicinとCDDPによる比較-, 第114回日本外科学会学術総会, 2014年4月5日, 京都

学内グラント 報告書

平成25年度 学内グラント終了時報告書

腫瘍の代謝多様性を利用した核医学診断法
および治療階層化手法への応用

研究代表者 久慈 一英 (国際医療センター 放射線科(核医学科))

研究分担者 佐伯 俊昭*, 上田 重人*

緒言

固形腫瘍内での低酸素状態は、特異な微小環境を反映し、異常な脈管構造の出現によって、主に血流低下によって生じる酸素供給と酸素消費との間の不均衡で生じるとされる。また、低酸素環境では低酸素誘導因子(hypoxia-inducible factor-1; HIF-1)が発現し、HIF-1によって誘導された腫瘍新生血管は、腫瘍侵襲性や遠隔転移を促し、腫瘍成長のための安定した血流を供給するとされる¹⁾。結果的に低酸素状態は悪性腫瘍の進行を助長している。また、固形腫瘍内での低酸素状態は、化学放射線療法において治療抵抗性を来す主要因と考えられている。このため、癌治療において、固形腫瘍の低酸素領域を視覚化することは、癌治療効果や予後を改善する上で重要と考えられる。陽電子放出断層撮影 Positron Emission Tomography (PET) は、生体内代謝系を画像化できるが、¹⁸F-フルオロミソニダゾール (¹⁸F-fluoromisonidazole; FMISO) は、PET用低酸素イメージング薬剤である。血液放射能比では、1.2程度を越えると低酸素状態になっていると報告されている²⁻⁴⁾。

我々は、従来から報告⁵⁻⁷⁾の多い、脳腫瘍や頭頸部腫瘍でFMISOによる低酸素PET/CT検査の有用性を検討してきたが^{8,9)}。従来報告の少なかった乳癌のFMISO-PETの有用性について検討した。さらに、術前化学療法にて(¹⁸F-fluorodeoxyglucose; FDG)-PETは治療効果の判定に有用であることが示されてきたが¹⁰⁾、FDGとFMISOの両者を検討することにより、どのように低酸素状態が変化するかについて検討した。

材料と方法

*国際医療センター 乳腺腫瘍科

FMISO合成

FMISOの合成は、GrirsonらおよびTangらにより提示された方法により放射性薬剤管理基準に従った院内ガイドラインに則り製造されている^{11,12)}。概要は、院内サイクロトロンで合成されたフッ化水素(¹⁸F)水溶液に、炭酸水素カリウムとKryptofix-222を加え、十分に乾燥させた後、1-(2'-ニトロ-1'-イミダゾリシル)-2-*o*-テトラヒドロピラニル-3-*o*-オシル-プロパンジオール(NIPPT)と反応させた。反応物を1 mol/mL塩酸で加水分解し、これから液体クロマトグラフィにて [¹⁸F]フルオロミソニダゾールを分離精製した。

対象

対象は、乳癌患者のうち、術前または臨床病期2期以上の治療前化学療法前後の患者で同意の得られた患者である。75検査を実施し、17患者では化学療法開始後2サイクル後にも検査を施行した。

PET/CT検査

治療前診断時および術前科学療法施行2サイクル目でFDGおよびFMISOによるPET/CT検査を施行した。FDG-PET/CT検査は、FDGを体重あたり3.7 MBq/kg投与後、1時間後から体幹部を1ベットあたり2分で撮像した。FMISO-PET/CT検査では、FMISOを体重あたり7 MBq/kg投与後、2時間後から胸部を1ベットあたり15分かけて撮像した。その後1ベットあたり5分で頭部から上腹部まで撮像した。

FMISO 静脈採血

初期初期の治療前12例患者では、静脈血を採取し、血液放射能濃度と病変集積との関係を確認した。従来は、血液放射能と病変放射能との濃度比を定量値として評価する論文が多いため、SUV定量性の確認のためである。

定量測定

乳房原発病変に球形立体関心領域を設定し、FDG

およびFMISOのSUVmax値を得た。治療後に集積がわかりにくい時は、CT上で腫瘍該当部に球形立体関心領域を設定して測定した。集積が乏しい場合は、乳腺のバックグラウンド集積に相当すると考えられる。

結果

採血カウントを行った12例では、乳癌病変によって、FMISO集積度は血液対腫瘍カウント比では 1.22 ± 0.54 で、SUVmaxでは 1.82 ± 0.82 となり、腫瘍により差が認められた。FMISOの血液対腫瘍カウントとSUVmaxの間には良好な相関が認められた ($\rho = 0.965, P < 0.001$) (図1)。定量には、SUVmaxが利用できると考えられた。血液放射能比に相当する値は、SUVmaxで1.8程度となった。組織型との関係では、Luminal型とNon-luminal型に大きく分類した場合にFDG-SUVmaxおよびFMISO-SUVmaxともにNon-luminal型にてLuminal型よりも高い傾向があった(図2)。

治療前後に検査を施行できた17例では、FDG

集積度が、治療前は 11.4 ± 7.1 (4.5-28.0) 治療後は 6.9 ± 7.0 (1.6-26.2)であった ($p = 0.0002$)。一方FMISO集積度は、 2.2 ± 0.6 and 1.8 ± 0.7 であった ($p = 0.0015$)。反応群 (Responder) 12例と非反応群 (Non-responder) 5例となった。さらに、それぞれの集積度は、治療前ではFDG-SUVmax ($p = 0.38$) およびFMISO-SUVmax ($p = 0.52$) と差が無かったが、治療後は、FDG-SUVmax ($p = 0.012$) とFMISO-SUVmax ($p = 0.0009$) で有意に差が認められた。特に、反応群では2サイクル後にFMISO-SUVmaxが2.0未満になることで判別できることが示された(図3, 4)。治療前および2サイクル後のFDGおよびFMISO集積度の関係は大きく変わらず、FMISO集積度がFMISO-SUVmax = 1.8を越えるとFDG集積度増加度が高くなる関係が示された(図5)。

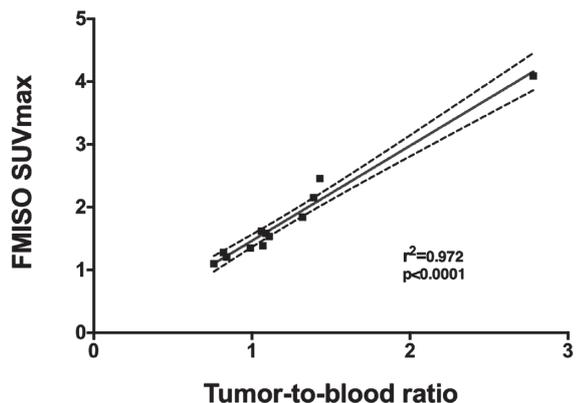


図 1.

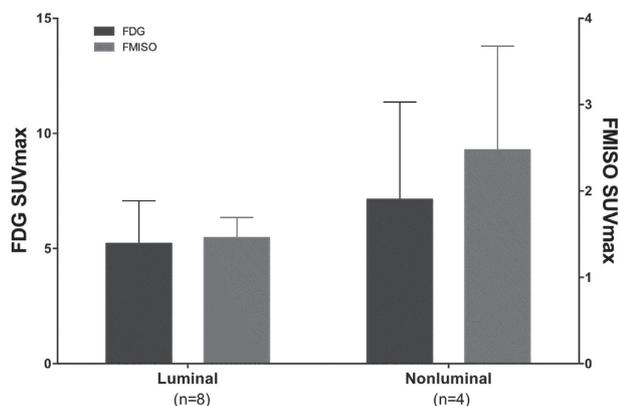


図 2.

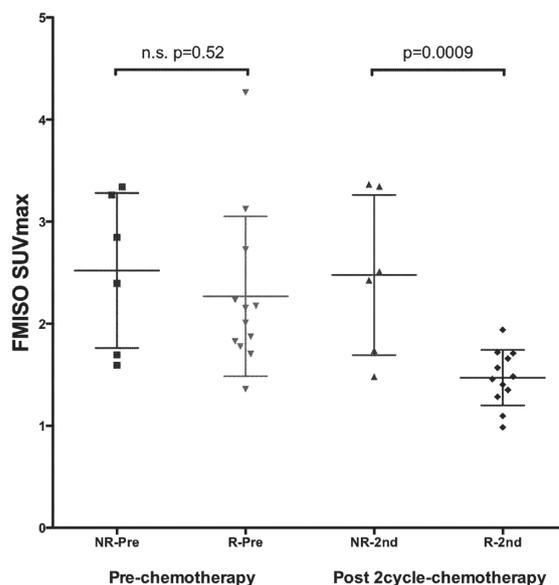


図 3.

Responder: Abraxan + EC
cT3N1M0、IIIIa、ER(-)、PgR(-)、HER2(-)

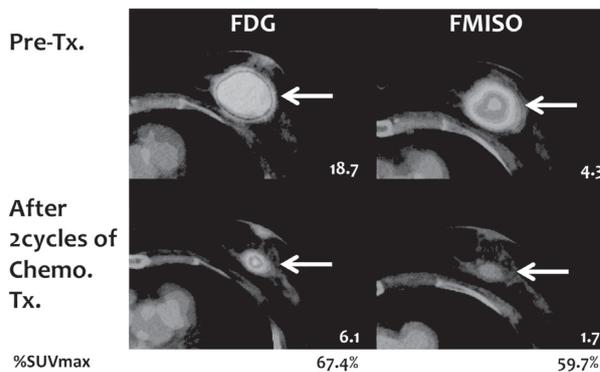


図 4.

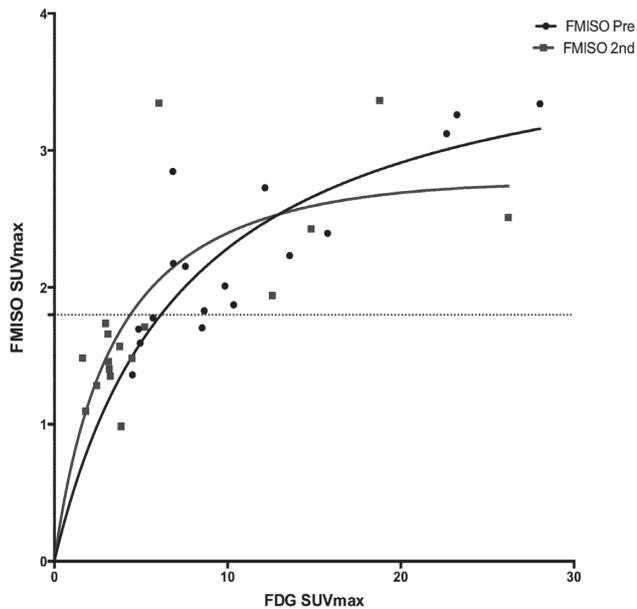


図 5.

考 察

乳癌病変において、FDGおよびFMISO集積性の多様性が確認できた。低酸素が強い腫瘍にてFDG集積が高くなることが確認された。治療後では、治療効果の高い群でFMISO集積が低下することが確認された。FMISO集積とFDG集積の関係は、直線関係では無く、FDG集積度は、FMISO集積が高い程、急速に増加する傾向を認めた。これは、低酸素状態になってから糖代謝が急に亢進することを示していると推察した。つまり、乳癌が低酸素状態になると、低酸素のない状態でのFDG集積からさらに増加することを示している。これは、低酸素状態で生じるHIF-1 α が、FDGを癌細胞内に代謝的に蓄積させるグルコース-6リン酸ヘキソキナーゼを活性化させるためと考えられる¹³⁾。逆に、治療反応群では治療開始2サイクル後にFMISO-SUVmaxが2.0未満になることが示された。我々の血液放射能濃度とFMISO-SUVの関係から低酸素状態は、SUVが1.8程度を越えると低酸素状態が生じていることになるので、FMISO-SUVmax = 2.0はほぼ低酸素状態になる境界値と考えて良いと思われる。肺癌や進行頭頸部癌で同様の報告がなされている。このため、治療効果があれば、癌細胞の糖代謝亢進が残存していても、癌組織では相対的に低酸素状態が急速に改善することが推測できる。つまり、低酸素イメージングは、治療効果を糖代謝よりも早期に反映していることが推察された。

今後は、乳腺腫瘍科で研究されている光イメージングによるヘモグロビン酸素化状態との相関を検討して、腫瘍内低酸素状態と治療効果や治療反応

予測におけるFMISO-PET検査の位置付けを検討する予定である。

文 献

- 1) Kizaka-Kondoh S, Konse-Nagasawa H. Significance of nitroimidazole compounds and hypoxia-inducible factor-1 for imaging tumor hypoxia. *Cancer Sci* 2009;100:1366-73.
- 2) Rajendran JG, Wilson DC, Conrad EU, Peterson LM, Bruckner JD, Rasey JS, et al. [¹⁸F]FMISO and [¹⁸F]FDG PET imaging in soft tissue sarcomas: correlation of hypoxia, metabolism and VEGF expression. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2003;30:695-704.
- 3) Rasey JS, Koh WJ, Evans ML, Peterson LM, Lewellen TK, Graham MM, et al. Quantifying regional hypoxia in human tumors with positron emission tomography of [¹⁸F]fluoromisonidazole: a pretherapy study of 37 patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996;36:417-28.
- 4) Koh WJ, Rasey JS, Evans ML, Grierson JR, Lewellen TK, Graham MM, et al. Imaging of hypoxia in human tumors with [¹⁸F]fluoromisonidazole. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1992;22:199-212.
- 5) Gagel B, Reinartz P, Demirel C, Kaiser HJ, Zimny M, Piroth M, et al. [¹⁸F] fluoromisonidazole and [¹⁸F] fluorodeoxyglucose positron emission tomography in response evaluation after chemo-/radiotherapy of non-small-cell lung cancer: a feasibility study. *BMC Cancer* 2006;6:51.
- 6) Spence AM, Muzi M, Swanson KR, O'Sullivan F, Rockhill JK, Rajendran JG, et al. Regional hypoxia in glioblastoma multiforme quantified with [¹⁸F]fluoromisonidazole positron emission tomography before radiotherapy: correlation with time to progression and survival. *Clin Cancer Res* 2008;14:2623-30.
- 7) Rischin D, Hicks RJ, Fisher R, Binns D, Corry J, Porceddu S, et al. Prognostic significance of [¹⁸F]-misonidazole positron emission tomography-detected tumor hypoxia in patients with advanced head and neck cancer randomly assigned to chemoradiation with or without tirapazamine: a substudy of Trans-Tasman Radiation Oncology Group Study 98.02. *J Clin Oncol* 2006;24:2098-104.
- 8) 久慈一英, 島野靖正, 今林悦子, 松田博史. PET/CTによる低酸素イメージング. *臨床放射線* 2011;56:1177-86.
- 9) 久慈一英. Basic Neuroscience: 脳腫瘍の低酸素イメージング. *Annual Review 神経* 2011;2011:53-9.

- 10) Ueda S, Saeki T, Shigekawa T, Omata J, Moriya T, Yamamoto J, et al. ^{18}F -Fluorodeoxyglucose positron emission tomography optimizes neoadjuvant chemotherapy for primary breast cancer to achieve pathological complete response. *Int J Clin Oncol* 2012;17:276-82.
- 11) Tang G, Wang M, Tang X, Gan M, Luo L. Fully automated one-pot synthesis of [^{18}F]fluoromisonidazole. *Nucl Med Biol* 2005;32:553-8.
- 12) Grierson JR, Link JM, Mathis CA, Rasey JS, Krohn KA. A radiosynthesis of fluorine-18 fluoromisonidazole. *J Nucl Med* 1989;30:343-50.
- 13) Kubota K, Tada M, Yamada S, Hori K, Saito S, Iwata R, et al. Comparison of the distribution of fluorine-18 fluoromisonidazole, deoxyglucose and methionine in tumour tissue. *Eur J Nucl Med* 1999;26:750-7.

研究成果リスト

論文

- 1) Ueda S, Nakamiya N, Matsuura K, Shigekawa T, Sano H, Hirokawa E, Shimada H, Suzuki H, Oda M, Yamashita Y, Kishino O, Kuji I, Osaki A, Saeki T. Optical imaging of tumor vascularity associated with

proliferation and glucose metabolism in early breast cancer: clinical application of total hemoglobin measurements in the breast. *BMC Cancer* 2013;13:514.

学会発表

- 1) 久慈一英, 島野靖正, 上田重人, 佐伯俊明, 今林悦子, 松田博史, 瀬戸陽. F-18-fluoromisonidazole (FMISO) PET/CTによる乳癌の低酸素イメージング, 第72回日本医学放射線学会学術集会, 平成24年4月, 横浜
- 2) Kuji I, Shimano Y, Ueda S, Saeki T, Seto A, Yamane T. Changes of glucose metabolism and hypoxic status during neoadjuvant chemotherapy for breast cancer by using PET/CT imaging, 第73回日本医学放射線学会学術集会, 平成25年4月, 横浜
- 3) Kuji I, Ueda S, Saeki T, Shimano Y. Change of hypoxic status during neoadjuvant chemotherapy for breast cancer by using PET/CT imaging, Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging 2014 Annual Meeting, 平成26年6月, バンクーバー・カナダ

特許出願

なし

学内グラント 報告書

平成25年度 学内グラント終了時報告書

肺扁平上皮癌に対するアロマターゼ阻害剤選択の可能性

研究代表者 阿部 佳子 (総合医療センター 病理部)

研究分担者 田丸 淳一*

緒言

エストロゲンは、乳癌のみならず卵巣癌、直腸癌、食道癌、甲状腺癌、腎細胞癌、骨肉腫などにおいて癌化や増殖に関与することが知られている。今後、エストロゲンの関与が明らかとなれば、ホルモン療法が治療のひとつに加えられうる悪性腫瘍が未だ残されていると考える。

肺癌については、非喫煙女性に、肺腺癌が多いことから、肺非小細胞癌におけるエストロゲンの関与について複数の研究が行われてきた。ある種の肺非小細胞癌ではestradiolとEGFの相互作用によるMAPK依存性の細胞増殖メカニズムが明らかにされている。また、肺非小細胞癌におけるアロマターゼの発現は、免疫組織化学染色やlaser-capture microdissectionを用いたRT-PCR法により示され、肺腺癌の88%に達することが報告されている。よって、このような細胞増殖系では、エストロゲン産生酵素であるアロマターゼの阻害剤が、組織局所のエストロゲン濃度上昇を抑制し、細胞増殖を抑えることが期待される。

肺の扁平上皮癌は、気管支の中核側にできることが多く、手術が難しい症例も多い。適正なadjuvant therapyが待たれるにも関わらず、腺癌に対する分子標的療法が普及してきたのに対し、扁平上皮癌はベバシズマブによる肺出血の副作用が知られるように、治療困難な“非腺癌”であり、新しい治療法が望まれる。

女性においてはホルモン補充療法の有無や、初潮の時期、閉経の時期の違いが、肺癌の発症率に関係することが報告されており、概して体内エストロゲンレベルが高い時期の長いことが肺癌の発症に何らかの関係を持つと考えられている。一方で、閉経後女性における喫煙が、血中性ホルモンの上昇と相関するという疫学的報告があり、喫煙がリスクファクターとなる扁平上皮癌の発症や進行にもエストロゲンの影響が介在

する可能性は十分に考えられる。

本研究は、アロマターゼ阻害剤が肺扁平上皮癌に対する治療のひとつとなる可能性を模索するものであるが、周知のごとくアロマターゼ阻害剤は乳癌の治療に用いられており、乳癌と肺扁平上皮癌におけるエストロゲンの働きの相違を認識する必要がある。エストロゲン受容体には2つのサブセットがあるが、乳癌と肺非小細胞癌ではエストロゲン受容体のサブセット、アロマターゼの発現部位に違いがあることがわかっている。乳癌では、エストロゲン受容体 α (ER α)が癌細胞に発現し、アロマターゼが癌細胞および間質に高率に発現するのに対して、肺非小細胞癌では、エストロゲン受容体 β (ER β)とアロマターゼが、肺癌細胞において、高率に共発現することを我々は以前に報告した。肺癌においては、局所で癌に必要なエストロゲンの供給がなされる可能性があり、アロマターゼ阻害剤による抗エストロゲン作用の有効性が期待されると同時に、乳癌とは異なるエストロゲン受容体サブセットを優位に持つことから、抗エストロゲン作用の違いや治療対象の選択の違いが生じる可能性がある。

これまでの我々の研究では、アロマターゼとER β の癌細胞における同時発現は、非小細胞癌の中の組織型(腺癌、扁平上皮癌、大細胞癌)間に差異が見られず、男女間にも差異が見られなかった。アロマターゼとエストロゲン受容体の発現が見られる限り、男性に多い肺扁平上皮癌においても、同様にアロマターゼ阻害剤が治療の選択に挙がる可能性があると考えられる。(当研究は埼玉医科大学総合医療センター倫理委員会の承認を得ている(申請番号472))

材料と方法

1. 症例に対する免疫組織化学染色

研究対象：埼玉医科大学総合医療センターで、2005年から2012年の間に外科的に切除された肺扁平上皮癌76症例。男性64症例、女性12症例。平均年齢68.6 \pm 7.5歳(44-84歳)。高分化型15症例、中分化型53症例、

*総合医療センター 病理部

低分化型8症例. 最大腫瘍径 37.7 ± 21.0 mm.

方法: 免疫組織化学染色に用いた抗体および方法は表1に示す. 免疫染色の評価方法は, ホルモン受容体, Ki-67, p53の発現率については, 癌細胞500個あたりの陽性率を算定し, aromataseについては, 10%以上陽性のものについて, 陽性, 弱陽性にわけて評価した.

2. 培養細胞実験

研究対象: 肺扁平上皮癌の培養細胞3種 (RERF-LC, EBC-1, CK2) (理化学研究所より購入).

方法: 3種の培養細胞から蛋白を抽出し, 上記免疫染色に用いたものと同様の抗体を用いて, Western blotting法により各ホルモン受容体およびアロマターゼ蛋白の有無を検討した. 比較対照としてMCF-7

(乳癌, ER α を持つ), LN-Cap-FGC (前立腺癌, ARおよびER β を持つ), HSC-1 (皮膚扁平上皮癌, ER α およびER β を持つ)の3種類の培養細胞から得た蛋白を必要に応じて同時に流した.

結果

1. 症例に対する免疫組織化学染色 (図1)

• ER α 陽性症例は4例 (陽性率10.91-16.89%), PgR 陽性症例は3例 (陽性率14.94-37.60%), AR 陽性症例は6例 (いずれもごく一部に陽性となるのみ)であったのに対し, ER β は1症例を除く75症例に陽性となり, 平均 $51.37 \pm 37.11\%$ の陽性率を示した.

• aromataseに対する染色では, 陽性30症例, 弱陽性37症例, 陰性9症例であった.

表 1. 免疫組織化学染色

抗体	clone	前処理	希釈倍率	抗体供与会社
ER α	SP1	heat	x1	Roche
ER β	14C8	autoclave	x1000	Gene Tex Inc
AR	AR441	autoclave	x100	DAKO Cytomation
PgR	1E2	heat	x1	Roche
CYP19	#677/H7	-	X6000	Dr.Evans DB, Novartis (contribution)
Ki67	MIB1	heat	X100	DAKO Cytomation
p53	DO-7	heat	x40	DAKO Cytomation

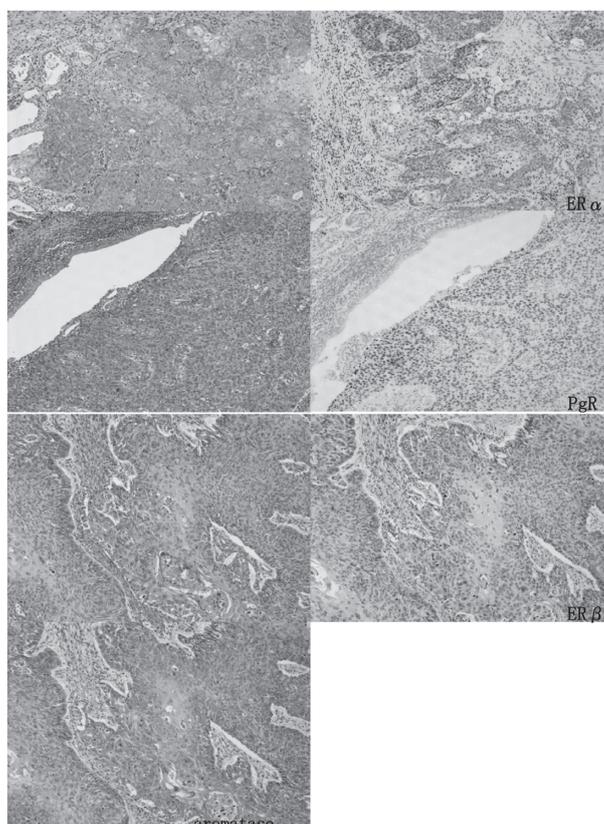


図 1. 免疫組織化学染色の結果.

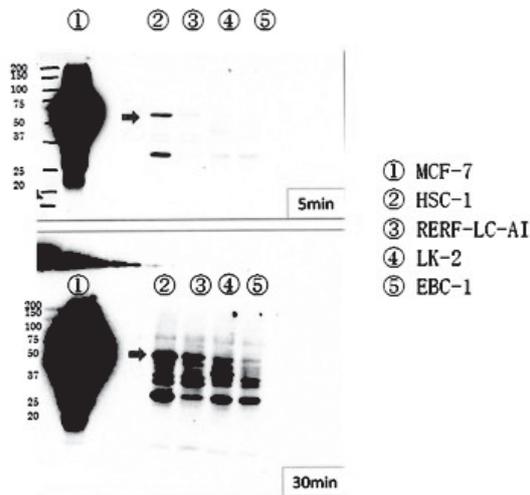
- ER β の陽性率と増殖能を呈するKi-67 LIとの間に相関関係は見られない (R squared 0.1447).
- ER β の陽性率とp53陽性率との間に相関関係は見られない (R squared 0.0076).
- aromataseの染色性に応じてER β の陽性率を比較すると、陰性例 $34.72 \pm 7.93\%$ 、弱陽性例 $49.98 \pm 28.46\%$ 、陽性例 $58.07 \pm 24.59\%$ であった。aromataseの発現が強い程ER β の陽性率は上昇する傾向が見られるが、統計学的有意差は認められない。
- 癌の分化度別にER β の陽性率を比較したところ、高分化型 $49.78 \pm 31.82\%$ 、中分化型 $49.38 \pm 25.84\%$ 、低分化型 $57.74 \pm 28.21\%$ であった。低分化型扁平上皮は高分化、中分化と比較して陽性率が高い傾向が見ら

- れるが、統計学的有意差は認められない。
- 男性症例、女性症例にわけてKi-67 LIとER β の発現率の相関関係を見ると、男性でR squared 0.0940に対して女性ではR squared 0.3151で、統計学的に有意とはいえないが女性ではER β の陽性率が高いものがKi-67 LIが高い傾向にある。

2. 培養細胞実験 (図2 (a)-(d))

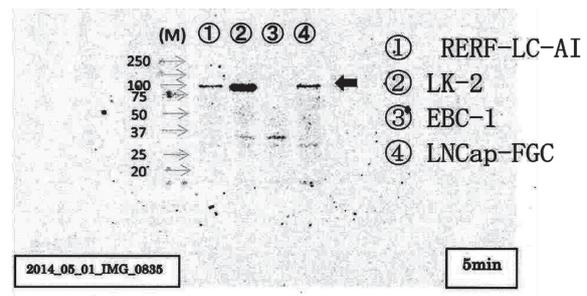
- Western blottingの結果では、RERF-LC-AIはER α + (弱い) /ER β +/PgR+/aromatase+, LK-2はER α -/ER β +/PgR-/aromatase+, EBC-1はER -/ER -/PgR-/aromatase+の3つの異なる発現パターンを呈した。なお、ARの発現はいずれにも認められない。

(a) ER α



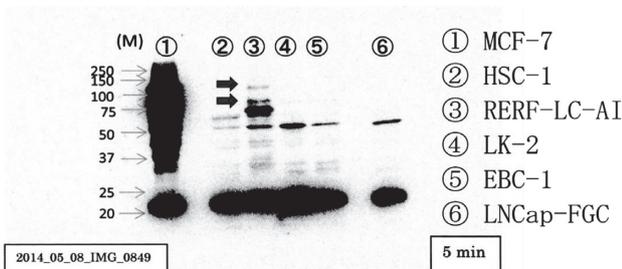
ER- α (SP1) 67kDa
10%SDS-PAGE, 30 μ g apply Fento, Filmにてexposure

(b) ER β



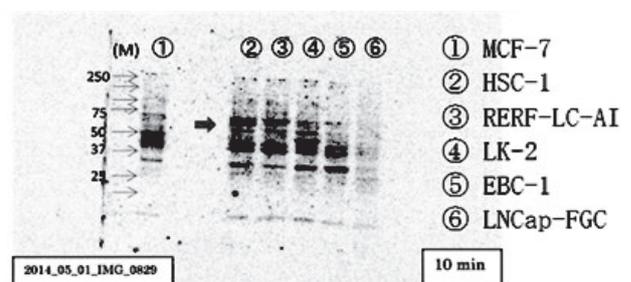
ER β (14C8) 67kDa
10%SDS-PAGE, 50 μ g apply Fentoにてexposure

(c) PgR



PgR (1E2) 94kDa (PgRA) 120kDa (PgRB)
10%SDS-PAGE, 50 μ g apply Fentoにてexposure

(d) aromatase



Aromatase 58kDa
10%SDS-PAGE, 50 μ g apply Fentoにてexposure

図 2. Western blottingの結果.

考 察

肺扁平上皮癌では、ER β と aromatase の発現が高率に見られることが確認された。ER α , PgR, AR については、陽性症例数が少なく、陽性所見も部分像であることが多い。よって、局所で産生されるエストロゲンはER β を介して何らかの作用をするものと考えられる。現時点では、Ki-67 LI および p53 発現率と関連性は見いだせていないが、低分化な扁平上皮癌でER β の発現が高い傾向にあることや、女性の肺扁平上皮癌に限るとKi67 LI とER β の発現に正の相関傾向がうかがわれる。これらのカテゴリーに属する症例が現時点では少ないため、症例を加えて有意差がでるか確認するとともに、予後データを加えた解析を続ける予定である。

また、ER β の働きについて、何らかの仮説が得られた場合、ホルモン受容体発現の異なる培養細胞を用いて実験を行う準備段階にある。

研究成果リスト(論文, 学会発表, 特許出願等)

- 1) Verma MK, Miki Y, Abe K, Suzuki T, Niikawa H, Suzuki S, Kondo T, Sasano H. Intratumoral localization and activity of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in non-small cell lung cancer: a potent prognostic factor. *J Transl Med* 2013;11:167.
- 2) Iida S, Kakinuma H, Miki Y, Abe K, Sakurai M, Suzuki S, Niikawa H, Akahira J, Suzuki T, Sasano H. Steroid sulphatase and oestrogen sulphotransferase in human non-small-cell lung carcinoma. *Br J Cancer* 2013;108(7):1415-24.
- 3) Yazdani S, Miki Y, Tamaki K, Ono K, Iwabuchi E, Abe K, Suzuki T, Sato Y, Kondo T, Sasano H. Proliferation and maturation of intratumoral blood vessels in non-small cell lung cancer. *Hum Pathol* 2013;44(8):1586-96.

学内グラント 報告書

平成25年度 学内グラント終了時報告書

未熟児新生児領域における非侵襲的臓器血流指標を用いた
新たな循環管理法の開発

研究代表者 石黒 秋生（総合医療センター 新生児科）

本研究は、研究期間として4年間を予定しており、本報告書では、ランダム化比較試験開始に至る経緯について報告する。

緒言

早産児の子宮外環境移行期における循環不全は、脳室内出血などの中枢神経系合併症発症や、新生児期、乳児期死亡と関連することが知られている。それゆえ新生児集中治療室においては嚴重な循環管理が行われているが、過去の報告では1500g未満の極低出生体重児では39%が循環サポートの対象となつたとされている。

これまでの新生児領域における主要な循環管理目標は昇圧及び血圧の安定化、維持であった。しかし、低血圧が予後不良のリスク因子であることが示される一方、それらに対する昇圧治療については、数々のランダム化比較試験が試みられたにもかかわらず、その有効性を肯定する報告がほとんど存在しないことが近年認識されるようになった。現在、血圧にかわる、あるいは血圧に加えた新たな循環指標が必須であることはすでに国際的コンセンサスとなっている。

循環不全は、2006年の国際コンセンサス会議において、全身的な血流分布不全と定義された¹⁾。従って、末梢臓器を含めた臓器血流を維持し、その分布を正常化する事が究極的な治療目標となる。さらに、循環不全の診断には、低血圧の存在は必須ではなく、末梢循環不全の存在が不可欠であることが指摘され、その臨床的評価の重要性が強調された。末梢臓器循環は循環不全発症早期から変動する。特に早産児においては、循環不全の病期の進行、すなわち代償期、非代償期から、治療への反応が乏しい不可逆期へ至るまでの経過が早いとされ、循環動態の異常を早期に発見し治療介入を行う点で、末梢循環評価が重要な意味を持つ。

従来の末梢循環指標である尿量、皮膚色、毛細

血管最充填期間などは非連続的、主観的、半定量的パラメータであり、それらの臨床的有用性を検討した報告では、循環管理における意義はおおむね限定的であると結論されてきた。1990年代にこれらの従来のパラメータにかわる、連続的、定量的評価手法の一つであるレーザードップラー法による非侵襲的血流量測定法が開発されたが、近年装置の安定性が向上し、臨床応用に耐えうる手法へと発展した。我々は、この装置を用いて、早産児を対象に、循環管理における有用性を検討してきた。

先行研究では、極低出生体重児を対象とし、脳室内出血発症群と非発症群における生後48時間までの皮膚血流量を比較した。結果として、出血群における皮膚血流量は生後18,24時間で非出血群と比較して有意に低く、その後生後48時間までに急速に回復した。脳室内出血はその血流回復期に発症しており、虚血再灌流障害による脳室内出血発症メカニズム仮説に矛盾しない結果であった。さらに多重ロジスティック回帰分析では生後24時間の皮膚血流量が唯一の脳室内出血予測因子であること、ROC解析では脳室内出血に対して高い感度(88%)、特異度(93%)、陰性的中率(99%)があること、を明らかにした²⁾。

今回我々は、上記結果をもとにして、脳室内出血前の皮膚低灌流を改善させる循環管理を行うことにより、従来の循環管理を行った場合よりも脳室内出血の頻度を減少させうる、と仮説をたて、その検証のためのランダム化比較試験を企画した。

材料と方法

本研究を開始するに当たり、以下の準備を行った。

1. 研究計画書の作成
2. 埼玉医科大学総合医療センター研究倫理委員会への申請

3. 大学病院医療情報ネットワーク研究センター (UMINセンター)への試験登録
4. データの症例登録システム構築
5. 必要機器の設置
6. 研究協力者に対する研究内容周知

1. 研究計画書の作成

本研究は、脳室内出血の発症をアウトカムとし、従来の血圧を指標とした循環管理法に対する血流量を指標とした循環管理の優位性を示すことを目標とした研究であり、上記2群におけるランダム化比較試験が必要である。

ランダム化比較試験を計画するに当たり、統計学専門家による統計学的助言が必須である。我々は医学統計学研究センターに依頼し、助言をえて研究計画書の作成を行った。

2. 埼玉医科大学総合医療センター研究倫理委員会への申請

上記研究計画書に加えて、同意書、同意撤回書を作成し、倫理委員会への申請を行った。

3. 大学病院医療情報ネットワーク研究センター (UMINセンター)への試験登録

近年、特に介入を伴う臨床試験を開始する際には、その試験が、ある条件を満たした登録機関にあらかじめ登録されていることを必要条件とされるようになってきている。本邦においてはUMINセンターがその条件を満たした機関であり、我々は同機関で臨床試験登録を行った。

4. データの症例登録システム構築

今回対象の症例登録・無作為化は中央登録方式を採用した。症例登録システムの構築はUMINセンターのインターネット医学研究データセンター (INDICE) に依頼した。

5. 必要機器の設置

機器の不足による研究遂行困難を回避するため、複数の機器を設置した。

6. 研究協力者に対する研究内容の周知

研究に関する資料を作成し、研究協力者を対象に複数回のカンファレンスを行い、研究内容を周知した。

結果

埼玉医大総合医療センター倫理委員会に申請し、2013年8月2日に承認を得た。

UMINセンターで臨床試験登録を行った(試験ID: UMIN000013296)。

UMINセンター INDICEにて4/28より臨床試験登録システムの運用を開始した。

以下に研究計画の概要を示す。なお、詳細な研究計画書はUMINセンター臨床試験登録システム内の

ホームページで公開予定としている。

臨床試験の名称: 極低出生体重児の脳室内出血に対する血圧指標型循環管理と血流量指標型循環管理の有効性と安全性に関する非盲検ランダム化並行群間比較試験。

1. 試験の目的

出生時から循環不全を発症した極低出生体重児に対して、血流量を指標とした循環管理が、従来の血圧を指標とした管理と比較して、脳室内出血を始めとする中枢神経系合併症、脳性麻痺、精神運動発達遅滞などの発症を減少させるかを検討する。

2. 対象患者

以下の選択基準のすべてを満たし、除外基準のいずれにも該当しない新生児。

1) 選択基準

以下の全ての基準を満たす患者を対象とする。

- ①当院(埼玉医大総合医療センター)で出生された新生児
- ②NICUに入院された出生体重1500g未満の早産児
- ③両親より別紙同意書に同意のサインが得られた者

2) 除外基準

- ①染色体異常、奇形症候群、先天性心疾患を有する者
- ②重症新生児仮死
- ③在胎23週未満

3. 試験の方法

1) 試験の種類

非盲検ランダム化並行群間比較試験

2) 比較する治療法

- 血圧指標群: 平均血圧を指標に循環作動薬を投与する
- 血流指標群: 皮膚血流量を指標に循環作動薬を投与する

それぞれの治療群では、それぞれの目標値

A. 血圧指標群は平均血圧値を在胎週数相当以上に維持する

B. 血流指標群はcut-off値以上に維持する

を設定し、その目標を達成するように治療介入し、その成績を比較する。

3) 治療法のランダム割り付け

被験者の各治療群への割付けは、最小化法(minimization method)を利用し、UMINセンター(大学病院医療情報ネットワーク研究センター)が作成したコンピュータプログラムをネットワーク上で遠隔使用して、入院処置担当者が割付ける。最小化法の割付因子(層化因子)は出生体重(1000g未満, 1000g以上)と性別(男, 女)の二つとする。

4. 評価項目

- 1) 主要評価項目
脳室内出血の発症
- 2) 副次的評価項目(退院までの評価)
 - 2-1. 早期新生児期死亡(生後7日以内の死亡)
 - 2-2. 一歳時死亡(一歳以内までの死亡)
 - 2-3. 脳室周囲白質軟化症(PVL)の発症
 - 2-4. 壊死性腸炎の発症
 - 2-5. 未熟児網膜症の発症
 - 2-6. 要治療の有無
 - 2-7. 治療目標非達成の有無
- 3) 追跡調査での評価項目(退院後の評価)
 - 3-1. 修正37-40週における頭部MRI異常の発生
頭蓋内出血, 脳室周囲白質軟化症などを含む, 後天的因子により発症したと考えられる異常, 退院時のMRIから当院放射線科による判定.
 - 3-2. 脳性麻痺
1歳6か月時に発達外来担当医が判定.
 - 3-3. 修正1歳6ヶ月における発達遅延
出生予定日から1歳6ヶ月時点における新版K式発達検査による運動, 認知適応, 言語・社会性項目, および総合判定におけるDQ値, 臨床心理士による判定.
 - 3-4. 修正3歳における発達遅延
出生予定日から3歳時点における新版K式発達検査による運動, 認知適応, 言語・社会性項目, および総合判定におけるDQ値, 臨床心理士による判定.

5. 観察および検査項目

- 1) 血圧等のバイタルサイン
通常の診療上の必要性に従って測定, 電子カルテ上に記録されたものを抽出する.
- 2) 皮膚血流量測定
レーザードップラー血流量計(LDF-2000, ネクシス, 福岡)を足背に装着して7日間の連続測定.
- 3) インピーダンス法による心拍出量測定
心拍出量モニター(エスクロンミニ, 平和物産, 東京)の電極を装着し, 生後2, 6, 12, 24, 48時間に1時間ずつ連続測定.
- 4) 心エコー検査による諸計測
左室ポンプ機能(EF, FS, mVcfc), 末期左室壁応力(ESWS), 左室心拍出量(LVCO), 上大静脈血流量を計測. 生後6, 24, 48, 72時間に測定.
- 5) 脳循環評価
近赤外線分光装置(オメガモニター BOM-L1W, オメガウェーブ, 東京)のプロープを前額に装着し, 生後2, 6, 12, 24, 48時間に1時間ずつ連続測定.

*上記装置は, 皮膚上にプロープを装着するのみで非侵襲的に測定を行うことが出来る.

6. 統計解析

- 4.1) 症例の内訳
歳代の解析集団, 試験実施計画書に適合した対象集団, 中止症例数を群の識別とともに表示する.
- 4.2) データの要約
連続値として得られる全ての検査項目については, 治療群, 観測時点ごとに基礎統計量(最小値, 最大値, 25%点, 中央値, 75%点, 平均値, 標準偏差)を算出する.
- 4.3) 背景因子の解析
基礎統計量を算出する(検定はしない).
- 4.4) 主要評価項目の解析
 1. 評価項目: 脳室内出血の発症
 2. 評価方法: 脳室内出血の発症割合を次式で定義する.

脳室内出血の発症割合 =

出生後, 生後7日の時点で出血が確認された症例数 / 各群の症例数

各治療群の発症割合と血流量指標群の血圧指標群に対する粗発症リスク比と粗発症オッズ比を推定するとともに, 割付因子を共変量としたロジスティック回帰分析を適用し, 血流量指標群の血圧指標群に対する調整発症オッズ比を推定する(点推定と95%信頼区間).

7. 目標症例数

- 1) 目標症例数
血圧指標群220例, 血流量指標群220例, 計440例
- 2) 設定根拠
従来の血圧指標群での脳室内出血の発症率を全国平均値から13%と推定し, 本試験で検討する新しい皮膚血流量を指標とした血流量指標群での脳室内出血発症率を6%と期待した場合, 有意水準5%, 両側検定で検出力80%を保持するのに必要な標本の大きさは各群220例, 合計440例必要となる¹⁾.

8. 研究期間

倫理委員会承認後～平成29年12月31日
症例登録期間: 平成26年4月28日～平成29年8月31日

9. 研究の実施場所

埼玉医大総合医療センター 総合周産期母子医療センター新生児集中治療室(NICU)および後方病床(GCU).

図1に試験のアウトラインを提示する.

考察および研究成果リスト

約8か月の準備期間を経て, 2014年5月より

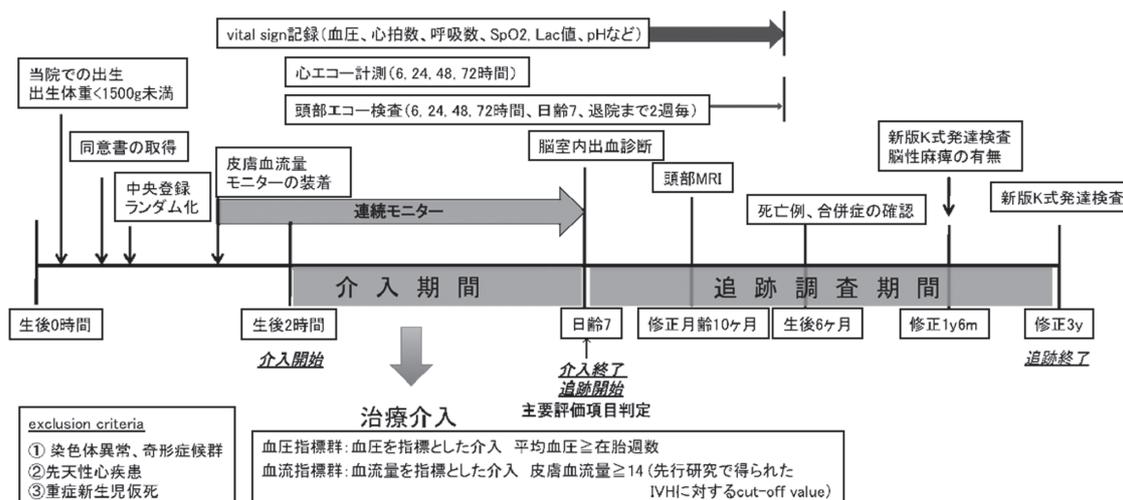


図1. 試験のアウトライン.

ランダム化比較試験を開始した。準備に際しては、研究者、研究協力者、統計担当者、登録システム開発者との長期にわたる綿密な協議により研究の質を十分に高められたと考える。

近年、特に介入を要する臨床試験は、国際的な基準を満たした機関への事前の試験登録が必須とされるようになってきている。本邦では、UMINセンターの他に、財団法人日本医薬情報センター（主に製薬企業の実施する臨床試験を対象）、日本医師会（主に医師主導型治験を対象）が臨床試験登録サイトを立ち上げている。

さらに、これらの試験登録や症例登録システム構築に当たって、統計担当者の任命が必要とされた。大学内では該当する担当者は存在せず、外部の統計学者との契約が必要となった。今後、大学内での臨床試験をつつがなく遂行するためにも、統計担当者の大学内常駐が望まれる。

参考文献

- 1) Antonelli M, Levy M, Andrews PJ, Chastre J, Hudson LD, et al. Hemodynamic monitoring in shock and implications for management. International Consensus Conference, Paris, France, 27-28 April 2006. Intensive Care Med 2007;33:575-90.
- 2) Ishiguro A, Suzuki K, Sekine T, Sudo Y, Kawasaki H, Itoh K, Kanai M, Kato I, Sobajima S, and Tamura M. Skin blood flow as a predictor of intraventricular hemorrhage in very low birth weight infants. Pediatr Res 2014;75:322-7.

研究成果リスト

- 1) Ishiguro A, Sakazaki S, Itakura R, Fujinuma S, Oka S, Motojima Y, Sobajima H and Tamura M. Peripheral blood flow monitoring in an infant with septic shock. Pediatr Int 2014 (in press).

学内グラント 報告書

平成25年度 学内グラント終了時報告書

2分子会合体認識抗体を用いた脳疾患モデル動物の
ニューロン間情報伝達異常の解析

研究代表者 小谷 典弘 (医学部 生化学)

研究分担者 村越 隆之*, 中野 貴成*

緒言

1972年, SingerとNicolsonは動物細胞膜が脂質二重層から成り, その上には細胞膜上分子が多数存在すること, 同時にこれら細胞膜上分子は脂質二重層の流動に伴って膜上で常にダイナミックに運動していることを提唱した¹⁾. 1990年代に入って細胞膜上分子の運動についての研究が進められるようになり, 特定の細胞膜上分子同士が非常に短い一定時間内に膜上で会合する細胞膜上分子間相互作用の存在が実証され, 免疫細胞の活性化や一般の細胞内シグナル伝達に極めて重要であることが明らかとなってきた. このような学術的な背景の中, 我々は全く新規で実用的な細胞膜上分子間相互作用解析法の開発に成功した^{2,3)} (特許第4929462). 本法はEnzyme-Mediated Activation of Radical Sources (EMARS) と名付けた反応を利用し任意の細胞膜上分子と生理的に相互作用し「会合体」を形成する分子を生化学的に同定する方法である (EMARS法: Fig. 1).

一方, 脳のニューロンは活動電位が生じることで後位に存在するニューロンに電気信号を送り, 複雑かつ断続的な信号伝達を行うことで高次機能を維持している. これらが破綻すると, 鬱病などに代表される脳疾患が惹起される. 現在までに, 様々な脳疾患において多くの病態モデル動物が作成され, 疾患の起因となるニューロンの分子メカニズムの異常等が研究されてきた. しかし, これら分子メカニズムの異常が脳神経回路の信号伝達にどのような変調をきたし, 表現型である病態に関連していくかについては未だ不明な点が多く残されている.

本研究では, 申請者が長年研究してきた上記の細胞膜上分子間相互作用および細胞膜上分子「分子会合体」に焦点を当て, これらが神経細胞(ニューロン)の機能

にどのような影響を与えるかを解析し, これら会合体を認識する抗体の作製等を通して, 最終的に脳疾患モデル動物の病態と細胞膜上分子間相互作用の間に関連性があるかを検討することを目指す.

材料と方法

1. 培養神経細胞興奮刺激時における分子会合体形成変化

a) ATPによる刺激

培養神経細胞のNeuro2aを6 cmディッシュに播種し, 10 μ Mのレチノイン酸(和光純薬)で神経分化誘導をかけた. 72時間後に細胞を300 μ M suramin (Sigma)でATPシグナルをキャンセルした. その後, 代表的な細胞膜脂質ラフトマーカであるCTxBのHRP標識体 (LIST bio) を用いて, EMARS反応を行い, 細胞膜脂質ラフト上の会合体分子を網羅的にFITC標識した. その際, 100 μ MのATPで興奮刺激した細胞群および刺激しなかった細胞群のサンプルをそれぞれ作製した. これらのサンプルをSDSサンプルバッファーに溶解後, 10%のSDS-PAGEゲルにて電気泳動した. PVDF膜に転写したのち, anti-fluorescein antibody (Rockland)を室温1時間反応させた. 洗浄後, 2次抗体としてanti-goat IgG-HRP (santacruz)を室温1時間反応させ, 発色した.

b) KClによる刺激

培養神経細胞のNeuro2aを6 cmディッシュに播種し, 10 μ Mのレチノイン酸(和光純薬)で神経分化誘導をかけた. 72時間後に細胞をCTxBのHRP標識体 (LIST bio) を用いて, EMARS反応を行い, 細胞膜脂質ラフト上の会合体を網羅的にFITC標識した. その際, 50 mMのKClで興奮刺激した細胞群および刺激しなかった細胞群のサンプルをそれぞれ作製した. これらのサンプルをSDSサンプルバッファーに溶解後, 上記a)と同様にSDS-PAGEおよびウエスタン

*医学部 生化学

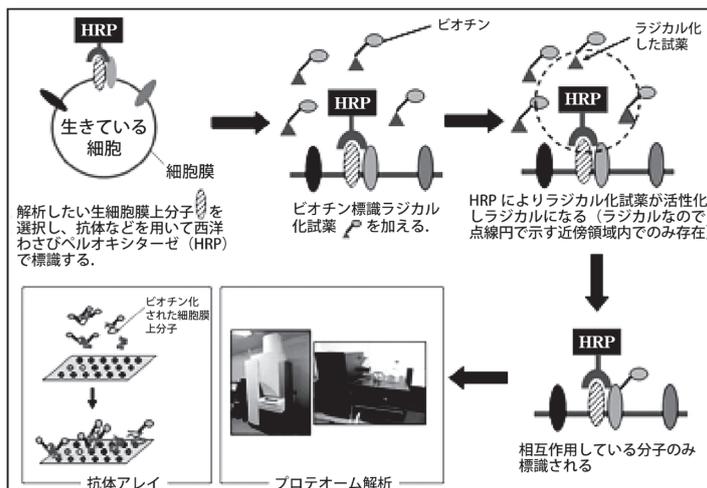


Fig. 1. EMARS法の概要.

プロットングを行った。

2. 人工的分子会合体形成によるニューロンの電気生理的形質変化の解析

a) 光感受性会合体分子発現ベクターの構築

光感受性分子であるシロイヌナズナのCRY2, CIB1⁴⁾をクローニングしたものをpBluescriptにサブクローニングした。このベクターを用い、分子会合体形成のために、以下のキメラ分子遺伝子を作製した。

- 1) 神経細胞にて細胞膜上分子会合体を誘導すると考えられているPSD95の一部領域と蛍光タンパク質および上記CRY2を含んだキメラ分子。
- 2) 上記1)を細胞膜上近傍に誘導させるための膜タンパク質であるclaudin1および2 (CLN1, CLN2)と蛍光タンパク質および上記CIB1を含んだキメラ分子。

これらをほ乳類細胞発現ベクターであるpcDNA3.1 (invitrogen)に組み込んだ。

b) 光感受性会合体分子の細胞への発現

上記の発現ベクターを、それぞれNeuro2a, HEK293, NIH3T3細胞にFuGENE (プロメガ)を用いてトランスフェクションした。単独トランスフェクションおよびCLN1 + PSD95, CLN2+PSD95の組み合わせでのダブルトランスフェクションを行った。

結果

1. 培養神経細胞活動刺激時における会合体形成変化

培養神経細胞のNeuro2aを用いて、神経細胞(ニューロン)が活動する場合に興奮刺激前後で会合体の形成に変化があるかを調べた。興奮刺激としては、ATPによる刺激およびKClによる刺激の

2種類の刺激法を試みた。それぞれの刺激中にEMARS反応を行い、脂質ラフト中で会合している分子群を網羅的に標識し、どのような分子が標識されているかウエスタンブロットングで確認した(Fig. 2)。

その結果、ATP刺激では刺激の有無で会合体を作る分子が有意に変化していることが分かった。一方、KClによる刺激では、有意な変化は観察されなかった。

2. 人工的分子会合体形成によるニューロンの電気生理的形質変化の解析

人工的に分子会合体を形成させるために、光刺激依存的に会合体を作る分子群を分子生物学的手法にてニューロン(神経細胞)に発現させた。CLN1および2(マウスcDNAライブラリからクローニング)に関しては、細胞膜上に発現が観察された。一方PSD95は細胞内に広く発現が観察された(Fig. 3)。

考察

我々は2008年にEMARS法を開発し、容易に細胞膜上の分子会合体を標識・解析できる状況にある。本研究では、1) 神経細胞(ニューロン)の分子会合体が神経機能にどのような影響を与えているかEMARS法で研究する、2) 神経機能に関与する分子会合体を同定する、3) それら会合体(基本的には2分子会合体)認識抗体を作製し、それを用いて実際の脳疾患動物の脳神経組織において会合体の発現量が増減しているか等を調べる、という3ステップの研究を目指している。その第一ステップとして、今回、実際のEMARS反応を用いて神経培養細胞の分子会合体を捉える実験を行った。実験に使用したNeuro2a細胞は、EMARS反応に対して非特異的の反応が少なく実験に使用するのに最適であることが事前実験で判明している。

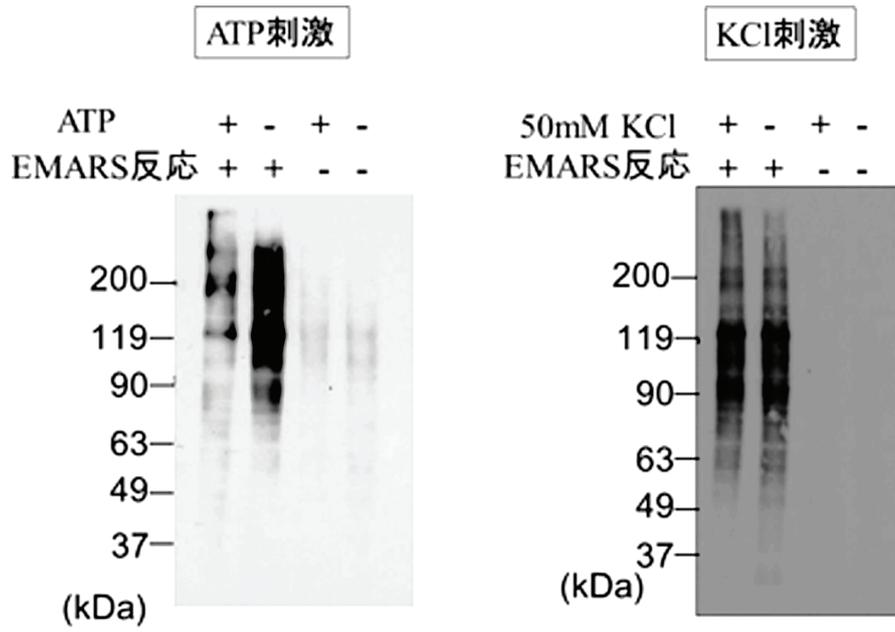


Fig. 2. 各刺激による分子会合体の変化.

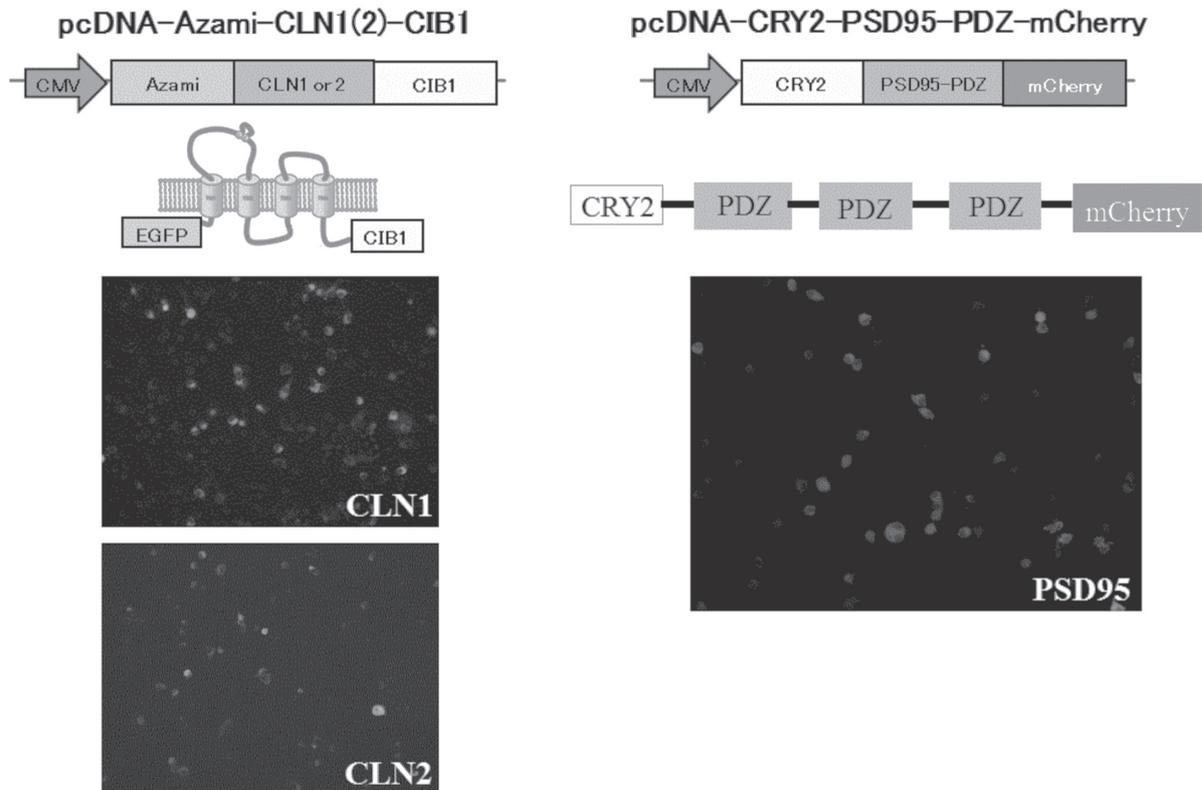


Fig. 3. CLN1および2, PSD95の発現細胞.

細胞内シグナル伝達のプラットフォームである脂質ラフトは、細胞機能に深く関与しているため、本研究では、まずこの構造体における分子会合体を対象とした。刺激方法はATPおよびKClによる脱分極誘発を行った。ATPはニューロンに興奮刺激を惹起することが知られており、神経伝達物質ではないかとの説もある。まず、ATP刺激中にEMARS反応で分子会合体を標識・解析すると、ATPによる刺激では分子会合体の構成分子が減少する傾向が見られた。一方、同様に興奮刺激を誘導するKCl添加では、有意な差は見られなかった。これは、予想外の結果であるが、Neuro2aはKClで脱分極が起こりにくい可能性があり、この点について精査することが課題である。今後は、ATPの刺激有無で変化している会合体分子をプロテオームで解析し、実際のニューロン（初代培養細胞・スライス培養）で同じ現象が観察されるか検討する予定である。さらに、判明した分子会合体を認識する抗体を作製することで、細胞イメージングなどの技術を通して、脳神経疾患でこれら分子会合体形成に変化が起こっているか検討することを考えている。

次に、光刺激により人工的に分子会合体を形成する手法⁴⁾により、神経細胞において分子会合体形成がどのような生理機能を持つのか精査することとした。これには以下の2つの目的がある。1) 上記分子会合体認識抗体を作製するときの抗原(2分子会合体抗原)を作製するのに本手法を使用する、2) 上述のEMARS法による分子会合体同定により判明した会合分子同士を人工的に会合体形成する系の構築を行う。しかし、上記2つの目的達成に必須なのは、会合体分子を同定することであるが、これには時間がかかる。従って、我々は準備実験として、近年ニューロンにおいて細胞膜上で分子会合体を誘導すると考えられているPDZドメインを持つタンパク質(PSD95等)を細胞膜近傍に光刺激で誘導し、より生理的条件下で

分子会合体を誘導する系を構築することとした。細胞膜上に発現するclaudin分子にPSD95分子のPDZドメインを持つ一部配列を光刺激で結合させ、PDZに結合する細胞膜上分子群の会合体形成を誘導することとした。現在までにこれらタンパク質のキメラ分子を発現させることに成功した。2つの分子をダブルトランスフェクションした細胞も作製した。今後は、これらが光刺激で会合体誘導を起こすか検討し、その後ウイルスベクターを作製して実際のニューロン(初代培養細胞・スライス培養)で同様の実験が出来るか検討する予定である。

参考文献

- 1) Singer SJ, and Nicolson GL. Science 1972;175:720-31.
- 2) Kotani N, Gu J, Isaji T, Udaka K, Taniguchi N, and Honke K. Biochemical visualization of cell surface molecular clustering in living cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2008;105:7405-9.
- 3) Honke K, and Kotani N. The enzyme-mediated activation of radical source reaction: a new approach to identify partners of a given molecule in membrane microdomains. J Neurochem 2011;116:690-5.
- 4) Kennedy MJ, Hughes RM, Peteya LA, Schwartz JW, Ehlers MD, Tucker CL. Rapid blue-light-mediated induction of protein interactions in living cells. Nat Methods 2010;7:973-5.

研究成果

- 1) 本家孝一, 山口亜利沙, 小谷典弘. GPI-アンカー型HRP融合タンパク質がつくる脂質ラフトドメイン, 第86回日本生化学会大会, シンポジウム, 平成25年9月12日, パシフィコ横浜

学内グラント 報告書

平成25年度 学内グラント終了時報告書

抗原表面結合型リポソームによるC型肝炎治療ワクチン開発

研究代表者 高木 徹 (医学部 微生物学)

緒言

Hepatitis C virus (HCV) はフラビウイルス科に属するRNAウイルスであり、世界中に約1.5億人、日本では約200万人の感染者が存在するといわれる。感染するとその大半が慢性感染を起し、経過とともに肝硬変、肝癌へと移行し死に至る¹⁾。主な治療薬としてリバビリンとインターフェロン療法や、近年では3剤療法であるDAAs (Direct Acting Antivirals) が使用されているが、リバビリン・インターフェロン療法において治癒率は50%程度で高価で副作用もあることから、HCVワクチン開発が急がれている。

脂質組成を不飽和脂肪酸にしたリポソーム表面に結合させた抗原は、抗原提示細胞によりCTLにcross presentation されることが報告されている²⁾。また申請者はフロイントアジュバントを用いた免疫において免疫原性が低いエピトープペプチドでも、リポソーム表面に結合すると強力なCTLを誘導できることを見出した³⁾。更にリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV) 由来のドミナントエピトープをリポソーム表面に結合し、マウスに免疫を行ったところ、非常に効果的な抗ウイルス反応を示すことを報告した⁴⁾。抗原を表面に結合したリポソームワクチンは様々な利点を有するが、特記すべきこととして、

- 1) わずか280 ngの抗原量とCpG 5 µgの1回免疫でウイルス感染を完全に防御できること、
- 2) ワクチンによる感染予防が難しいLCMVの持続感染変異株cl.13も完璧に防御できること、
- 3) CD4ノックアウトマウスへの免疫により、CD4陽性T細胞によるヘルプの非存在下でも長期のメモリーを誘導できることが証明されたこと、

などが挙げられる⁴⁾。

これらのことから、本研究ではHCVに由来するHLA-A2拘束性のエピトープペプチド14種類を用い、表面結合型リポソームワクチン開発を試みた。

方法と材料

1. HLA-A2トランスジェニックマウス

H-2Db^{-/-} β 2m^{-/-} double knockout miceにhuman β 2m-HLA-A2.1(α 1 α 2)-mouse H-2Db (α 3 transmembrane cytoplasmic) monochain 遺伝子を導入したHHDマウスを使用した。HHDマウスは仏・パスツール研究所・Lemonnier博士より供与された。

2. 免疫方法

リポソーム免疫ではリポソーム50 µlにCpG 5 µgをマウスにfoot padにて免疫し1週間後ブーストした。ペプチド免疫では抗原ペプチド50 µgとヘルパー T細胞エピトープペプチドHBVcore128-140 100 µgをインコンプリートフロイントアジュバンドと混ぜ皮下注射にて免疫を行った。組み換えウイルス免疫では、HCV-core, E1, E2またはNS3-5Aを発現する組み換えアデノウイルス(Ad-ST, Ad-NS)を5 x 10⁷ PFUを腹腔注射により免疫を行った。いずれも2週後にブーストし、その1週後に実験を行った。

3. IFN-γ ELISPOT assay

Mouse IFN-γ enzyme-linked immunospot (ELISPOT) set (BD Pharmingen, San Diego, CA)を用い、ナイーブマウスの脾細胞に対応したペプチドをパルスし40 GyのX線を照射したものを、免疫マウスの脾細胞と混ぜ2日間培養し測定した。

4. ⁵¹Cr Release assay

ナイーブマウスの脾細胞に対応したペプチドをパルスし40 GyのX線を照射したものを、免疫マウスの脾細胞と混ぜ7日間培養した。標的細胞(RMA細胞にHHD遺伝子を導入したRMA-HHD)に対応したペプチドをパルスし⁵¹Crを取り込ませ、96well plateにエフェクター細胞とE:T/100:1の割合で入れ4時間培養し、その上清をγカウンターにて測定した。

5. Vaccinia virus 感染実験

免疫マウスに2 x 10⁶ PFUの組み換えVaccinia virusを腹腔注射し5日後に卵巣を摘出し、凍結融解と超音波処理し段階希釈したウイルス液をBSC-1細胞に感染

させた。その2日後にクリスタルバイオレットにて細胞を染色しウイルス価を算出した。

6. Intracellular Cytokine Staining

免疫したマウスの脾細胞と対応するペプチド溶液、brefeldin A(Golgi plug)を混ぜ37°C, 5時間インキュベーションし標識抗体にてCD8陽性T細胞とIFN- γ を染色しFACS解析を行った。

7. Adoptive Transfer

マウスの尾静脈から 1×10^7 PFUの組み換えワクシニアウイルスを感染させた翌日に、試験管内で1回刺激を行ったeffector T細胞を 5×10^6 cells 移入し、4日後に血清ALTと肝臓中のウイルス量を測定した。

8. Transwell culture

HHDマウス腎由来初代培養細胞を標的細胞とし、24-well plateに 1×10^5 ずつ入れて培養し、組み換えワクシニアウイルス(VV-NS4)をm.o.i = 0.1で感染させた。ペプチドA2-12で5回、刺激を繰り返したCTLを、A2-12でパルスし放射線照(40 Gy)した正常脾細胞(1×10^5)と共に、E:T比3:1(3×10^5)と0:1の割合で入れ共培養した。Direct cultureでは標的細胞とCTLを直接共培養し、transwell cultureではpore size 0.4 μ m membrane上にCTLと脾細胞をのせ標的細胞と触れないように培養した。上清に抗IFN- γ 抗体(1 μ g/ml), 抗TNF- α 抗体(1 μ g/ml)を入れブロック試験を行った。2日後に標的細胞をホモジナイズし、BSC-1細胞を用いてウイルス価を算定した。

結果

1. リポソームワクチンと他の2種類の免疫方法との比較検討

14種類のHCV HLA-A2 epitope peptide (Table 1)について、①表面結合型リポソームワクチンによる免疫、②ペプチドをヘルパーT細胞エピトープペプチドと共にアジュバントに懸濁して免疫する方法、③組み換えアデノウイルス感染、の3つの免疫方法における免疫原性を比較した。免疫原性として、細胞傷害性の誘導とIFN- γ 産生T細胞誘導能を測定し、比較した。すると個々のエピトープについて、3種の免疫方法で全く異なる免疫原性が発揮されることがわかった(Fig. 1A, B)。

①のリポソームワクチンはウイルス感染防御において②のペプチドワクチンよりも優れていることは既に報告したが³⁾、この14種のリポソームワクチンで免疫したマウスに、それぞれのエピトープを発現する組み換えワクシニアウイルスでチャレンジしてみたところ、3つのワクチン(L-A2-8, L-A2-11, L-A2-12)が完全なウイルス感染防御効果を示すことが確認された(Fig. 1C)。この3つに共通して強いIFN- γ 反応誘導活性がみられ、特にL-A2-11とL-A2-12はCTL活性は殆ど誘導しないがウイルス感染を完全にブロックした。一方、L-A2-5はIFN- γ よりもCTL活性を誘導するが、有意なウイルス感染防御は認められなかった

Table 1. 合成したHLA-A2拘束性HCV由来ペプチド

Name	Restriction	Derivation	Residues	Sequence	Type
A2-1	HLA-A*0201	Core	35-44	YLLPRRGPRL	IV
A2-2	HLA-A*0201	Core	132-140	DLMGYIPLV	I
A2-3	HLA-A*0201	Core	178-187	LLALLSCLTV	V
A2-4	HLA-A*0201	E1	257-266	QLRRHIDLLV	III
A2-5	HLA-A*0201	E2	686-694	ALSTGLIHL	I
A2-6	HLA-A*0201	E2	726-734	LLFLLADA	III
A2-7	HLA-A*0201	NS3	1073-1081	CINGVCWTV	I
A2-8	HLA-A*0201	NS3	1406-1415	KLVALGINAV	II
A2-9	HLA-A*0201	NS3	1585-1593	YLVAYQATV	II
A2-10	HLA-A*0201	NS4A	1671-1680	VLAALAAAYCL	I
A2-11	HLA-A*0201	NS4B	1807-1816	LLFNILGGWV	II
A2-12	HLA-A*0201	NS4B	1851-1859	ILAGYGAGV	II
A2-13	HLA-A*0201	NS4B	1920-1928	WMNRLIAFA	I
A2-14	HLA-A*0201	NS5A	1992-2000	VLSDFKTWL	IV

既知の14種類のHCV-CTLエピトープについて、①リポソーム免疫、②ペプチドをヘルパーT細胞エピトープペプチドと共にアジュバントに懸濁して免疫、③組み換えアデノウイルス免疫、の免疫方法の比較検討。各エピトープ部分を含むHCVタンパクを発現する組み換えアデノウイルスを感染させたマウスにおける、⁵¹Cr-release assayとIFN- γ ELIPOT assayの結果を、その強さの組み合わせによりI-Vの5種類(Fig.1参照)に分けて表示している

(Fig. 1C). 以上から3種のリポソームワクチンにより誘導されるウイルス感染防御能は、細胞傷害活性よりもIFN- γ などの抗ウイルス活性を持つサイトカイン誘導によるものであると推測されたので、以下の実験を行った。

2. Adoptive Transfer実験

L-A2-12で免疫したマウスのT細胞を、Fig. 1A, Bと同様に試験管内でペプチド刺激を1回行い、adoptive transferに用いた。マウスに組換えワクシニアウイルスを静注で感染させ、翌日T細胞をtransferし、その4日後に血清と肝臓を採取してウイルス量とALT値の測定を行った。肝臓中のウイルス量は、細胞移入によりウイルス増殖が有意に抑制されることが確認された

(Fig. 2A). 血清のALT値は、細胞を移入してもALT値の増加はほとんど認められなかった (Fig. 2B). このことは、L-A2-12免疫で誘導されるT細胞が、細胞傷害を引き起こさずにウイルス増殖を抑制する可能性を支持していた。

3. Transwell実験

T細胞の残りはペプチド刺激を4回以上繰り返してline化し、in vitro 実験に用いた。この刺激過程で最初は非常に低かったCTL活性も増加し、実験直前には⁵¹Cr-release assayで74% (E/T ratio: 30 : 1) のkillingを示し、一方IFN- γ 産生はT細胞の92%で認められた。この細胞をtranswell plateに入れ、ワクシニアウイルスを感染させた標的細胞と直接接することなく、その

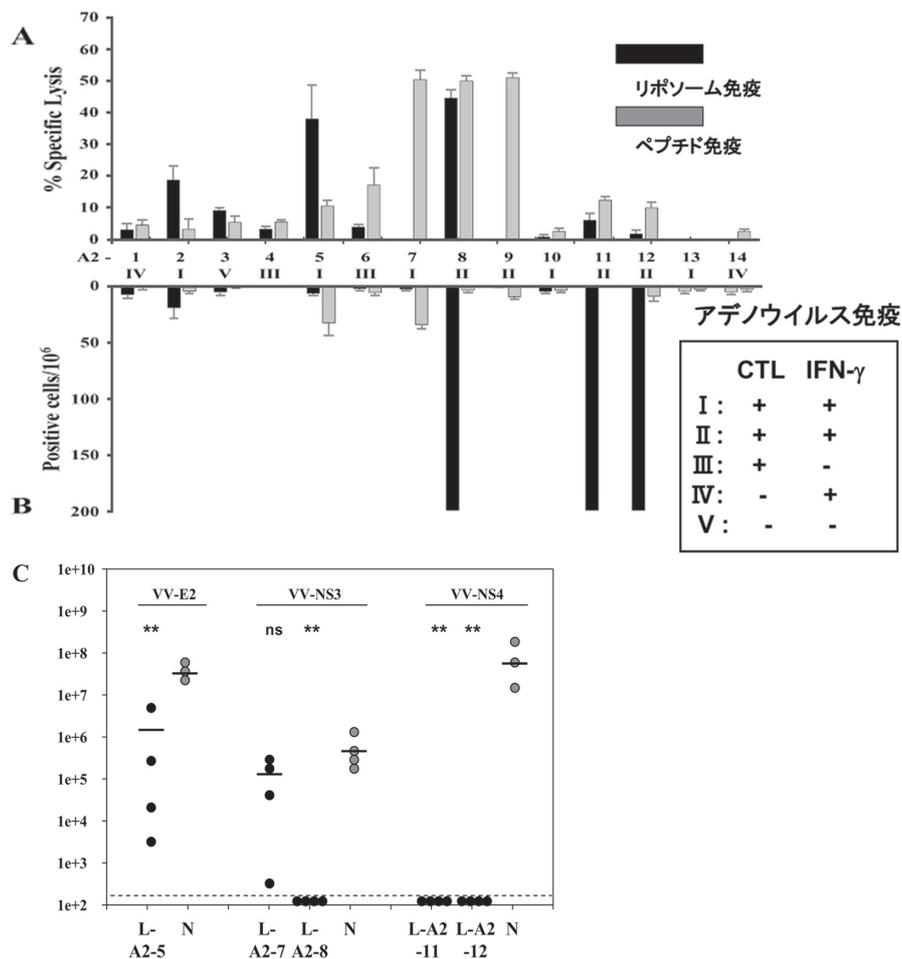


Fig. 1. Comparison of Liposome, IFA-peptide, and adenovirus immunizations. Each HLA-A2 Tg mouse received 50 μ l of liposome-peptide and 5 μ g of CpG (f.p.), 50 μ g of peptide and 100 μ g of HBV128-140 peptide emulsified in incomplete Freund's adjuvant (s.c.), or 5 x 10⁷ PFU of recombinant adenovirus expressing HCV structural or nonstructural proteins (Ad-ST or Ad-NS) (i.p.). The mouse was boosted after two weeks, and spleen cells were prepared seven days later for ⁵¹Cr release assays (A) and IFN-g ELISPOT assay (B): The immunized and naïve mice were challenged at one week after the last immunization with 2 x 10⁶ PFU of VV-E2, VV-NS3 or VV-NS4 (i.p.) and the virus titers in the ovaries were quantitated by plaque assays on BS-C-1 cells at day 5 postchallenge (C).

増殖に及ぼす効果を2日後に判定した。培養液には抗IFN- γ あるいは抗TNF- α 抗体を入れてブロッキング試験を行った (Fig. 3)。Fig. 3Bは標的細胞と一緒にplateに入れて培養したもので、effectorを加えないwellでのウイルス量と比較してeffectorの存在によりその増殖が有意に抑制されている。2種の抗体でのブロッキングを行うと、effectorによるウイルス増殖抑制効果に対する影響は非常に低いことが分かった。Fig. 3Aの transwell plate 実験で、effectorを標的細胞と接触させることなく培養しても、やはりeffectorの存在によりウイルス増殖が有意に抑制されることが認められた。そしてそこに2種の抗体を加えると、

effectorによる抑制作用の大半がブロックされた。ブロッキングは特に抗IFN- γ 抗体による効果が大きかった。

考 察

HLA-A2拘束性HCV CTLエピトープについて検討した結果、リポソーム免疫、ペプチド免疫、ウイルス免疫でそれぞれ異なる免疫反応が誘導された。反応の違いを生じる原因は不明であるが、それぞれの抗原提示メカニズムの違いがその可能性の1つとして挙げられる。

今回リポソームワクチンが示した非細胞障害性

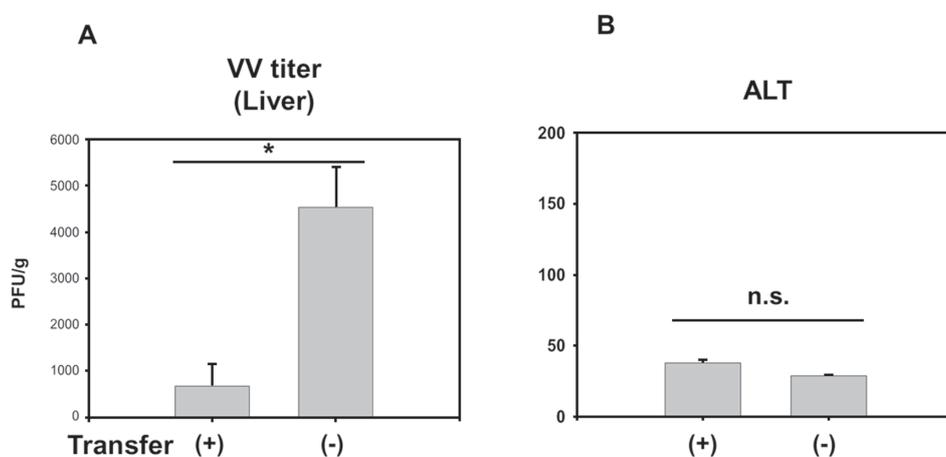


Fig. 2. Adoptive transfer experiments. Mice were infected with 5×10^6 PFU of recombinant vaccinia virus expressing HCV NS4 (VV-NS4) (i.v.) and the next day, received 1×10^7 of T cells (i.v.). Four days later, Serum and liver were taken from each mouse, and ALT concentration in serum and virus titer in liver were determined.

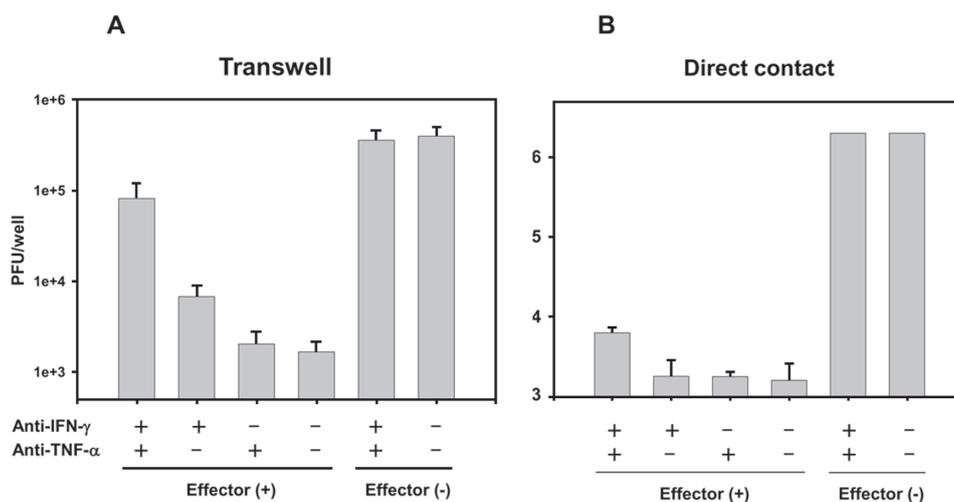


Fig. 3. T cells from mice immunized with L-A2-12 were cocultured with target cells (HHD-kidney cells) either in direct culture (B) or in the transwell system (A) at E/T ratio of 3:1 in the presence or absence of anti-IFN- γ or anti-TNF- α . Inhibition of recombinant vaccinia virus (VV-NS4) was determined by the plaque assays on BS-C-1 cells at day 2.

メカニズムによるウイルス増殖抑制メカニズムは、LCMV, HCV, HBVなどで報告されており、そのメカニズムの主体はIFN- γ などのサイトカインであるといわれている⁵⁾。このような非細胞傷害性メカニズムは、慢性感染症の防御において、細胞傷害による副作用を伴うことなくウイルスを排除できる。Lip.A2-12のようにこのメカニズムのみを選択的に誘導し抗ウイルス効果を発揮するワクチンは、慢性肝炎患者の肝障害を増強することなく治療効果を発揮する安全なワクチン開発につながるものとして期待できる。

Reference List

- 1) Saito I, Miyamura T, Ohbayashi A, Harada H, Katayama T, Kikuchi S, Watanabe Y, Koito S, Onji M, Ohta Y, Choo Q-L, Houghton M, Kuo G. Hepatitis C virus infection is associated with the development of hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:6547-9.
- 2) Taneichi M, Ishida H, Kajino K, et al. Antigen chemically coupled to the surface of liposomes are cross - presented to CD8 + T cells and induce potent antitumor immunity. *J Immunol* 2006;177(4):2324-30.
- 3) Takagi A, Kobayashi N, Taneichi M, Uchida T, Akatsuka T. Coupling to the surface of liposomes alters the immunogenicity of hepatitis C virus-derived peptides and confers sterile immunity.

Biochem Biophys Res Commun 2013;430(1):183-9.

- 4) Takagi A, Matsui M, Ohno S, Duan H, Moriya M, Kobayashi N, Taneichi M, Uchida T, Akatsuka T. Highly efficient antiviral CD8+ T-cell induction by peptides coupled to the surfaces of liposomes. *Clin Vaccine Immunol* 2009;16:1383-92.
- 5) Guidotti LG, Borrow P, Brown A, McClary H, Koch R, Chisari FV. Noncytopathic clearance of lymphocytic choriomeningitis virus from the hepatocyte. *J Exp Med* 1999;189:1555-64.

研究成果リスト

- 1) 高木徹, 堀内大, 種市麻衣子, 内田哲也, 赤塚俊隆. リポソーム表面結合によるHCV由来ペプチドの免疫原性変化と非細胞傷害性抗ウイルス活性の誘導, 日本ウイルス学会, 平成25年11月, 神戸
- 2) 赤塚俊隆, 高木徹, 堀内大, 種市麻衣子, 内田哲也. リポソーム表面結合によるHCV由来ペプチドの免疫原性の変化と非細胞傷害性抗ウイルス活性の誘導, 日本ワクチン学会, 平成25年11月, 三重
- 3) Akatsuka T, Takagi A, Horiuchi Y, Taneichi M, Uchida T. Coupling to the surface of liposomes alters the immunogenicity of hepatitis C virus-derived peptides and confers non-cytolytic antiviral immunity, 日本免疫学会, 平成25年12月, 千葉

学内グラント 報告書

平成25年度 学内グラント終了時報告書

消化管ホルモンIBCAPを用いた
生活習慣病治療への分子基盤の確立

研究代表者 横尾 友隆 (ゲノム医学研究センター)

緒言

日本人のライフスタイルの欧米化により、糖尿病、脂質異常症や肥満といった生活習慣病患者数は増加の一途をたどっている。そのため、疾患メカニズムの解明、より有効な治療法の確立が世界的にも急務となっている。

我々は、未知の消化管ホルモンをOligo-Cap SST法で探索し¹⁻²⁾、候補となる新規消化管特異的分泌タンパク遺伝子IBCAP (Intestinal derived Beta-cell Augmenting Promoter) の同定に成功し、その解析を進めてきた。これまでに、IBCAP遺伝子産物が膵β細胞の増加促進作用を持つ新規の消化管ホルモンと考えられることが強く示唆されている。

現在、消化管ホルモンであるインクレチン (GLP-1, GIP) はインスリン分泌を誘導することが明らかとなっており、また、膵β細胞保護作用との関連も示唆されている。GLP-1アナログ製剤やGLP-1分解酵素DPP-IVの阻害薬は、最近新しい糖尿病治療薬として臨床の場で大きな成功を収め注目されており、膵β細胞の保護、増殖作用についても期待されている³⁻⁵⁾。

これまでに得られているIBCAPの知見から、IBCAPはGLP-1, GIPに次ぐ第3のインクレチンと考えられるが、これまでに明らかにされている他の消化管ホルモンとは有意な相同性を持たない。

そこで本研究では、このIBCAPを標的とした糖尿病治療戦略の検討を行い、臨床応用へ向けた分子基盤の解明を目的とした。得られた結果からは、膵β細胞の質・量の恒常性維持機構あるいは新たな糖尿病発症機序の理解が得られるとともに、膵β細胞の再生にとどまらず、新たな糖尿病治療法や創薬の開発につながると思われる。

材料・方法

本研究では、新規消化管ホルモンIBCAPを第3の

インクレチンとして基礎研究を進め、糖尿病治療、再生医療へと応用を見据えて、下記の検討を行った。

IBCAP遺伝子産物の膵β細胞に対する増殖促進作用について、今回*in vitro*の培養細胞を用いた系で、EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) の取り込み能を測定し膵β細胞増殖促進作用を評価した。また、分化に対する作用については、アデノウイルスによる強制発現モデルマウスを解析した。

なお、動物実験については埼玉医科大学動物実験規定において決められた倫理基準に従って行った。

結果

IBCAPはこれまでにトランスジェニックマウス、ノックアウトマウスの動物実験から膵ラ氏島および膵β細胞増殖促進作用を持つことが示唆されている。そのため、今回、*in vitro*の培養細胞を用いた系で膵β細胞増殖に対する影響を検討した。膵β細胞培養細胞株であるMIN6細胞を用いてEdUの取り込みを指標に増殖能を確認した結果、IBCAP遺伝子産物は膵β細胞増殖刺激作用を持つ事を強く示唆する結果を得た (data not shown)。

また、IBCAPは膵β細胞増殖促進作用以外に、膵β細胞への分化誘導作用を持つ可能性が考えられたため、アデノウイルスを用いた肝臓を中心に強制発現するマウスモデルにおいて検討を行った。その結果、肝臓中にインスリン陽性細胞の発現が確認出来、これは、IBCAPによるTransdifferentiation作用による可能性が考えられた (data not shown)。

考察

IBCAPはインクレチン様作用を持つことから糖尿病治療の標的となり得る可能性を秘めている。今回本研究では、IBCAPの膵β細胞増殖促進作用の確認とともに、膵β細胞への分化誘導にも関与する可能性が考えられた。今後は、さらに詳細に膵β細胞への分化

に対する効果・作用についての検討が待たれる。

今回の結果より、IBCAPを標的とした糖尿病治療あるいは膵再生医療の創薬・臨床への応用が期待される。

謝 辞

本研究は埼玉医科大学 ゲノム医学研究センター ゲノム科学部門および実験動物施設において実施されました。御協力頂きましたゲノム医学研究センター 所長 岡崎康司教授，技術員 伊関美緒子さん，そして多くの共同研究者の方々に深謝致します。

また，このような学内グラントの助成を頂き，別所正美学長，医学研究センター長 松下祥教授に感謝申し上げます。

参考文献

- 1) Wang Y, Suzuki H, Yokoo T, Iida KT, Kihara R, Miura M, et al. WGEF is a novel RhoGEF expressed in intestine, liver, heart, and kidney. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;324:1053-8.
- 2) Watanabe K, Okamoto F, Yokoo T, Iida KT, Suzuki H, Shimano H, et al. SPARC is a major secretory

gene expressed and involved in the development of proliferative diabetic retinopathy. *J Atheroscler Thromb* 2009;16:69-76.

- 3) Drucker DJ, Nauck MA. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet* 2006;368:1696-705.
- 4) Drucker DJ. The role of gut hormones in glucose homeostasis. *J Clin Invest* 2007;117:24-32.
- 5) Campbell JE, Drucker DJ. Pharmacology, physiology, and mechanisms of incretin hormone action. *Cell Metab* 2013;17:819-37.

研究成果リスト

学会発表

- 1) 横尾友隆，菅原泉，渡邊和寿，鈴木浩明，島野仁，山田信博，岡崎康司，豊島秀男. 膵β細胞分化における消化管ホルモンIBCAPの役割，第11回RCGMフロンティアシンポジウム，2013年11月23日，埼玉県日高市

学内グラント 報告書

平成25年度 学内グラント終了時報告書

神経変性疾患モデルマウスを用いた新規行動解析法の構築と
認知機能改善薬の探索

研究代表者 鈴木 正彦 (保健医療学部 健康医療科学科)

研究分担者 柳下 聡介*, 吉川 圭介*, 淡路 健雄*

緒言

タウオパチーとは、過剰なリン酸化修飾を受けたタウタンパク質が脳内に蓄積することを特徴とする神経変性疾患の総称であり、記憶障害を呈する疾患である。アルツハイマー病もタウオパチーの一つである。

これまで、タウと記憶障害との関連性については、タウを過剰発現させた遺伝子改変マウスを用いた解析が主に行われており、リン酸化タウの蓄積によって記憶障害が惹起されることが報告されている¹⁾。しかし、タウが記憶維持において担う役割は何か、特にリン酸化タウの生理的な意義については不明のままである。これらを解明することは、基礎生物学的な観点からも、根本的な神経変性疾患の治療薬を開発するという観点からも、重要である。

タウの生理機能解明が進んでいない一つの要因として、適切なモデル動物に乏しいことが挙げられる。従来のタウ研究の主流は、タウを過剰発現させた遺伝子改変動物を用いたものであったが、遺伝子改変に依る影響を無視できないという欠点があった。特に、タウの過剰発現によって、軸索輸送障害が起きることなどが報告されている²⁾。

そこで、タウの生理機能解明のためには、遺伝子改変動物よりも、自然に近い状態でタウのリン酸化が起きるモデル動物が必要である。これまでに、遺伝子改変に依らないモデルとして、麻酔³⁾や絶食⁴⁾などが報告されている。しかし、このモデルでは行動試験ができないなどの欠点があった。

そこで、我々は別の刺激によって、内在性タウのリン酸化亢進を試みた。その結果、間断的低酸素負荷 (Intermittent hypoxia treatment; IHT) を継続的に施すことにより、タウのリン酸化を亢進させることに

成功した。本モデルマウスは、自然に近い状態でタウのリン酸化が起きるといった利点のみならず、行動実験や長期間に渡った実験が可能、作製にかかるコストが安価であるなど、様々な利点を有している。本研究は、新しいモデルを用いて、タウの生理機能を明らかにし、記憶・学習のメカニズム解明や神経変性疾患治療薬の創出に貢献するものである。

材料と方法

1. 実験動物

C57BL/6Jマウス (オス, 9週齢) を購入し、1週間後から実験に使用した。動物の取り扱いに際しては、埼玉医科大学実験動物部門の定める規定を厳守した。

2. 間断的低酸素負荷 (Intermittent Hypoxia Treatment; IHT)

マウスに間断的低酸素負荷 (IHT) を施した⁵⁾。その方法は以下の通りである。マウスをチャンバーに入れ、そこに窒素ガスを約 16 L/min で1分間注入し、マウスケージ内の酸素濃度を5%まで低下させた。その後、酸素濃度21%の室内空気を約 14 L/min で2分間注入し、マウスケージ内の酸素濃度を21%まで回復させた。この3分間の操作を1日8時間 (9時~17時) 行った。残りの時間は、通常環境下で飼育した。

IHTに関しては、まず、以下の三群を用意し、対照群との比較を行った。

- IH5D : IHTを5日間実施
- IH5DR2 : IHTを5日間実施したのち、2日間、通常環境下で飼育したもの
- ReIH5D : 上記IH5DR2と同じ操作の後、更に5日間、IHTを実施したもの

次に、28日間IHTを実施した群についても検討をした。

*医学部 薬理学

3. 脳組織からのTBS可溶性画分の抽出, ウェスタンブロッティング

IHTの後, マウスの脳から海馬を摘出した. 海馬は, ホスファターゼ阻害剤及びプロテアーゼ阻害剤を含むTBS中で破碎した. 破碎したサンプルを4℃にて32,000×*g*で20分間, 超遠心分離(Rotor: TLA45, ベックマン・コールター社)した後, 上清(TBS可溶性画分)を回収し, タンパク定量の後, ウェスタンブロッティング用のサンプルとして調整した.

ウェスタンブロッティングは一般的な方法に則り, リン酸化状態に関係なくタウを認識する抗体およびリン酸化部位特異的な抗体を用いて標識した.

4. Y字迷路試験

行動試験はY字迷路装置を用いた. 三本のアームをそれぞれA, B, Cとし, アームAの先端にマウスを置き, 10分間, 迷路内を自由に探索させた. マウスが進入したアームを順に記録した. まず, 異なるアームに3回連続で進入した場合を「コレクト」, それ以外の場合を「エラー」とした. そして, 評価は総進入回数及び交替行動(コレクトの数)を総進入回数-2で割って100をかけた値(交替行動率)を求めることによって行った.

5. 統計処理

データは統計解析ソフトPrism 6 (GraphPad Software社)を用いて解析した. まず, ANOVAで検定を行い, 有意である場合には, 対照群に対するDunnett検定を行った. 二群比較はt検定を実施した. いずれの場合にも, *p*値0.05未満を有意と見なした.

結果

1. 短期間のIHTによってタウのリン酸化は亢進する

IHTを行った群(IH5D, IH5DR2, ReIH5D)について, タウ関連抗体を用いてタウの総量やリン酸化レベルを解析した. まず, リン酸化状態に関係なくタウを認識する抗体(JM, 高島博士より供与)を用いて総タウ量を検討した. タウの総量は, 対照群, IH5D群, IH5DR2群, ReIH5D群の間では有意な差はなく, 一定であると考えられた.

そこで次に, タウのリン酸化特異的な抗体を用いて, IHTによるタウのリン酸化への影響を検討した. アルツハイマー病脳では過剰にリン酸化を受けたタウが凝集し, 神経原線維変化を形成している. 過剰にリン酸化を受けたタウは微小管との結合能が低下する. 従って, タウのリン酸化を解析することは, 病態との関連を解析する上で重要である.

解析の結果, IH5D群では, 対照群に比べ, いくつかの部位のリン酸化亢進が顕著に認められた. 具体的には, pSer199, AT8(pSer202/pThr205), pThr212, pSer214, pSer396, pSer404にリン酸化亢進が認めら

れた(Fig. 1). これらのリン酸化亢進部位は, 実際のアルツハイマー病脳でも報告のある部位である. 一方, AT270(pThr181), AT180(pThr231), pSer400に有意な変化は認められなかった(Fig. 1). なお, 一部のリン酸化タウについては, 矢頭のバンドで定量したものを示している.

次に, IHTを5日間実施した後, 2日間の通常飼育を実施したのについて, タウのリン酸化を調べた(IH5DR2). この群においては, タウのリン酸化レベルは対照群と同程度であった. よって, 通常環境下での飼育は, タウの脱リン酸化を亢進するものと考えられた. さらにReIH5D群では, タウのリン酸化は対照群と比べ, IH5D群ほど顕著な亢進は認められなかった. これは通常飼育を2日間挟んだことにより, タウのリン酸化を亢進させる機構が阻害されたためと考えられた.

2. 長期間のIHTによってもタウのリン酸化は亢進する

連続28日間でIHTを行った場合タウのリン酸化亢進レベルやタウのリン酸化パターンにどのような変化があるかを検討した. 総タウ量は対照群と同程度であった(Fig. 2).

一方, タウのリン酸化亢進レベルは対照群と比べAT270(pThr181), AT8(pSer202/pThr205), pThr212, pSer214, AT180(pThr231), pSer400, pSer396において顕著な増加が認められた.

特に, 短期間のIHTには認められなかった部位(AT270, AT180, pSer400)のリン酸化亢進が認められた. この結果から, タウのリン酸化パターンは, IHTの期間に依って変化していくことが解った.

3. タウのリン酸化に寄与するキナーゼの探索

タウのリン酸化が認められたため, それに寄与するキナーゼの探索を行った. まず, ERK1/2について検討を行った. 短期間処置では, ERK1/2の活性化は認められなかったが(Fig. 3A), 長期間処置ではERK1の活性化が認められた(Fig. 3B).

4. IHTマウスは行動試験が可能であり5日間のIHTは短期記憶に影響しない

本研究のモデルマウスは行動試験に供することができるのか, また短期間のIHTはマウスの短期記憶にどう影響するのかを検討するためY字迷路試験を行った.

まずIHT前に実験を行い, 二群(対照群, IHT群)に分けた. 両群の交替行動率に差はなかった. その後は, Fig. 4Aに示すように, IHTを5日間実施した後, その後の2日間の通常環境飼育後, さらにそのあとのIHT5日の後というそれぞれのポイントで試験を実施した. なお, この実験に関しては, 同一個体を用いて実施している.

行動試験の結果, どの段階でY字迷路試験を行っても, 交替行動率は対照群と同程度であった(Fig. 4C).

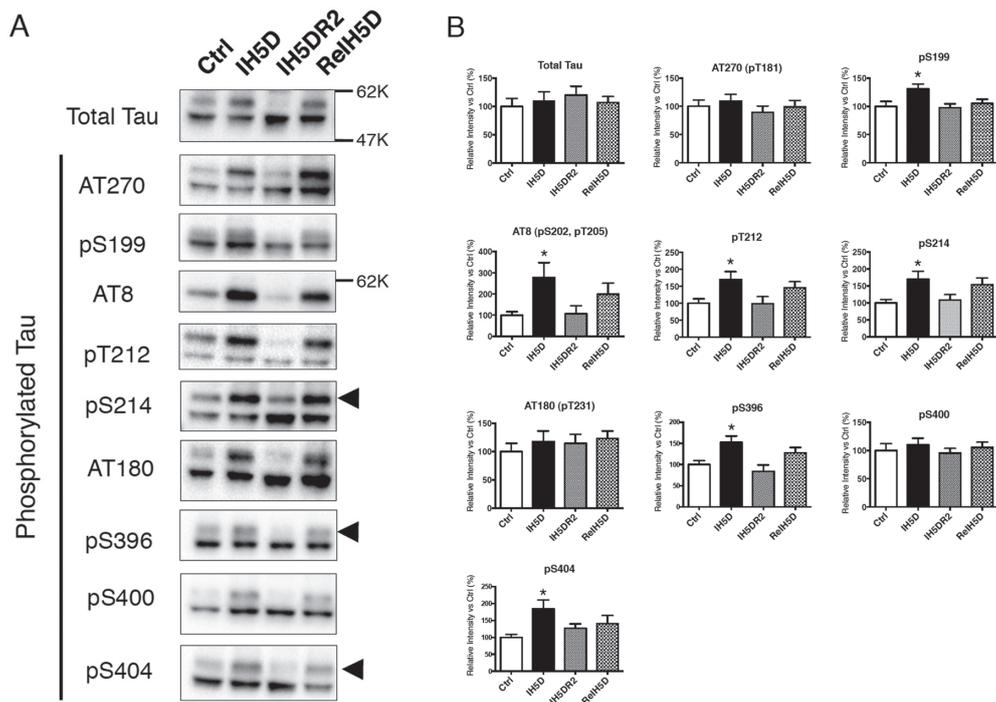


Fig. 1. 短期間のIHTがタウのリン酸化に与える影響. (A) 代表的なプロットを示す. (B) 定量結果を示す. (n=9; *p < 0.05 vs. Ctrl.)

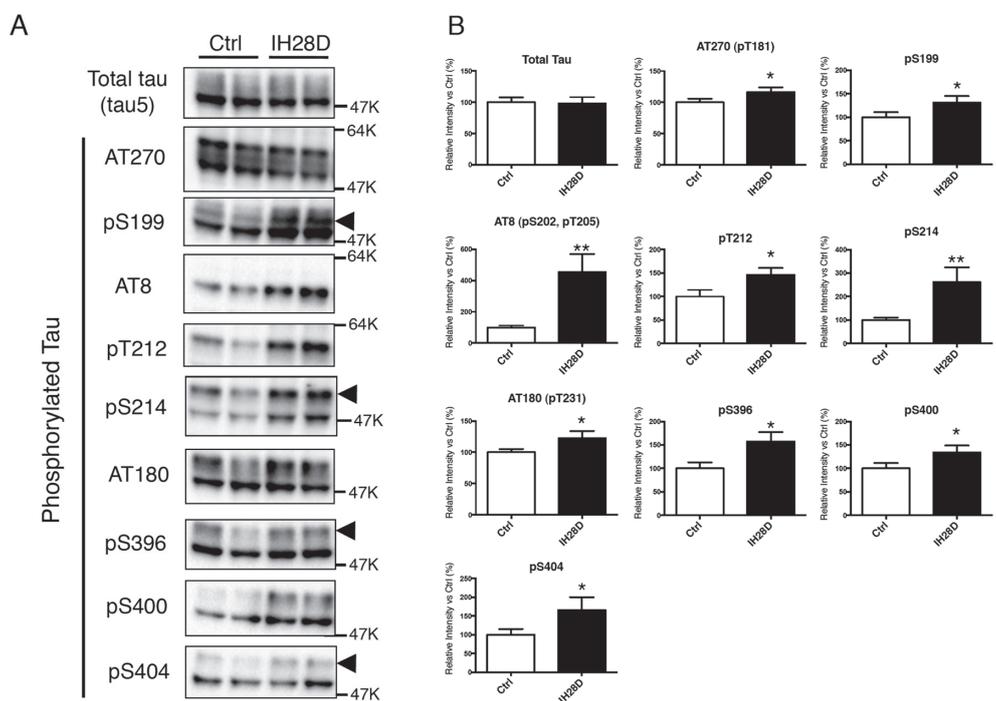


Fig. 2. 短期間のIHTがタウのリン酸化に与える影響. (A) 代表的なプロットを示す. (B) 定量結果を示す. (n=12; *p < 0.05, **p < 0.01 vs. Ctrl.)

また、総進入回数も対照群と同程度であったが、IHT群、対照群共にY字迷路試験の回数が増すに従い、減少する傾向にあった(Fig. 4B).

この結果から、IHTをしたマウスは行動試験に供することができることが解った。また、5日間のIHTは短期記憶に影響しないことが解った。

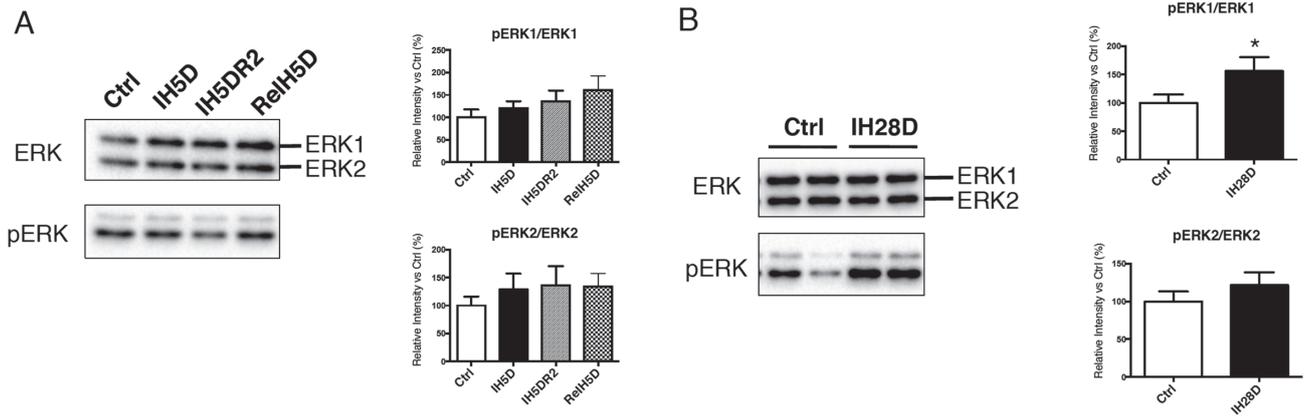


Fig. 3. IHTがERK1/2の活性に与える影響. (A) 短期間での結果を示す. (B) 長期間での結果を示す. n数は各々 Fig. 1, Fig. 2に対応. (* $p < 0.05$ vs, Ctrl)

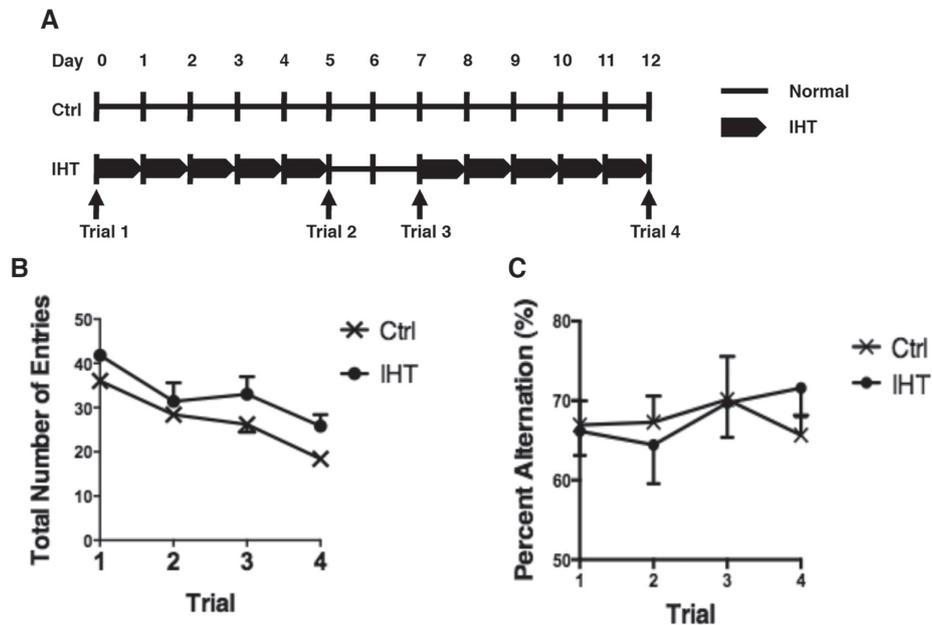


Fig. 4. Y字迷路試験. (A)Y字迷路試験の実実施計画. Y字迷路試験は, 次の通りに実施した. Trial 1:IHT実施前. Trial 2:IHTを5日間実施した後. Trial 3:IHTを5日間実施した後, 2日間の通常環境飼育後, Trial 4: IH5DR2と同じ条件で飼育した後, さらにIHTを5日間実施した後. (B) 総進入回数, (C) 交替行動率.

考 察

IHTによって, 内在性のタウに対して顕著なリン酸化亢進を起こせることが分かった. このマウスは行動実験に供することもできることが確認された.

内在性タウのリン酸化が亢進したモデルとして用いることで, 新たな知見が得られることが期待される.

参考文献

1) Kimura T, Yamashita S, Fukuda T,

Park JM, Murayama M, Mizoroki T, et al. Hyperphosphorylated tau in parahippocampal cortex impairs place learning in aged mice expressing wild-type human tau. *EMBO J* 2007;26:5143-52.

2) Stamer K, Vogel R, Thies E, Mandelkow E, and Mandelkow EM. Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. *J Cell Biol* 2002;156:1051-63.

3) Planel E, Richter KE, Nolan CE, Finley JE, Liu L, Wen Y, et al. Anesthesia leads to tau

hyperphosphorylation through inhibition of phosphatase activity by hypothermia. J Neurosci 2007;27:3090-7.

- 4) Planel E, Miyasaka T, Launey T, Chui DH, Tanemura K, Sato S, et al. (2004) Alterations in glucose metabolism induce hypothermia leading to tau hyperphosphorylation through differential inhibition of kinase and phosphatase activities: implications for Alzheimer's disease. J Neurosci 2004;24:2401-11.
- 5) Tagaito Y, Polotsky VY, Campen MJ, Wilson JA, Balbir A, Smith PL, et al. A model of sleep-disordered breathing in the C57BL/6J mouse. J Appl Physiol 2001;91:2758-66.

研究成果

学会発表

- 1) 鈴木星也, 柳下聡介, 淡路健雄, 鈴木正彦, 丸山敬. 内在性タウのリン酸化亢進マウスモデルの作製, 第86回日本生化学会, 平成25年9月, 横浜
- 2) 鈴木星也, 柳下聡介, 淡路健雄, 鈴木正彦, 丸山敬.

間歇的低酸素負荷による内在性タウのリン酸化亢進モデルマウスの作製, 第129回日本薬理学会関東部会, 順天堂大学(本郷キャンパス), 平成25年10月

- 3) 鈴木星也, 柳下聡介, 淡路健雄, 鈴木正彦, 丸山敬. 野生型マウスを用いた内在性タウのリン酸化亢進モデルの作製, 第32回日本認知症学会, 平成25年11月, 松本
- 4) 鈴木星也, 柳下聡介, 反町文香, 森泉茉耶, 淡路健雄, 鈴木正彦, 丸山敬. 内在性タウのリン酸化亢進モデルマウス, 第87回日本薬理学会年会, 平成26年3月, 仙台

特許出願

- 出願番号 : 特願2013-130358
 出願日 : 2013年6月21日
 発明の名称 : タウタンパク質のリン酸化が亢進された非ヒトモデル動物の製造方法
 発明者 : 柳下聡介, 鈴木正彦, 淡路健雄, 吉川圭介, 丸山敬, 鈴木星也
 権利者 : 学校法人埼玉医科大学

学内グラント 報告書

平成25年度 学内グラント終了時報告書

難治性悪性リンパ腫の増殖機構の解明と新たな治療法の開発

研究代表者 森 茂久 (医学教育センター)

緒言

悪性リンパ腫の治療成績は近年向上しているが、いまだに難治性、治療抵抗性の悪性リンパ腫が多く存在している。難治性、治療抵抗性となった悪性リンパ腫の一つの病態として「白血化」悪性リンパ腫が挙げられる。悪性リンパ腫の「白血化」は本来リンパ節で腫瘍を形成するリンパ腫細胞が治療経過中に末梢血中に出現、増殖する状態である。白血化が治療経過中に出現した場合には難治性であり、follicular lymphomaを除くと、いずれも予後不良である。また初発時にすでに白血化した状態では臨床病期IV期と進行期で、治療に抵抗性で治癒には至りにくい。

難治性、治療抵抗性を呈する悪性リンパ腫白血化の機序については知見は乏しい。リンパ節を場とし腫瘍を形成し増殖する悪性細胞が末梢血中で増殖する機序として、一つはリンパ系から血管系への侵入、そして「リンパ」節という増殖の支持環境が無い状態で血管内増殖が可能となる増殖機構の獲得がある。Dolcetti¹⁾らはマウスの系でT-lymphoblastic lymphomaでは、細胞接着分子である $\alpha 4 \beta 7$ の発現が白血化に関与することを報告している。白血化の過程は複雑であり、その他にも原因が複数存在することが考えられている。悪性リンパ腫細胞の白血化、血管内増殖の病態には、接着分子の関与が指摘されているが、その実態は不明である。白血化の病態解明が遅れている大きな原因として良好なモデルが無いことが挙げられる。増殖機構、特に血管内での増殖機構を解明することによって、その知見を元に有用なモノクローナル抗体や低分子薬を得られる可能性がある。

一方、血管内リンパ腫 (Intravascular Lymphoma: IVL) は、基本的に小血管腔内、特に毛細血管内に腫瘍細胞が存在するという特徴を持つ。CD29 ($\beta 1$ -integrin), CD54 (ICAM-1) などの接着因子発現の消失が血管外に遊走できずに血管内で増殖する原因であるとするPonzoni²⁾らの説もあるが、CD29, CD54が消失していないIVL症例もある。

IVL細胞には以下の特徴があり、血管内での細胞増殖機構解明への手がかりになると考えられる。

1) 血管内指向性: 血管内の方がgrowth advantageがある、血管外への浸潤能が弱い、またリンパ節へのホーミング能が弱い。2) 塊状増殖: 細胞間接着が強い。他の腫瘍でみられる血管内の腫瘍塞栓との病態が近似する。

本研究の大目標: 我々はIVL細胞株, SMCH-12を樹立したが、調査した限りにおいてIVL細胞株の樹立報告はない。SMCH-12の細胞生物学的解析を行い、血管内で増殖する機構に関連する知見を得る。IVL細胞株に特異的に発現する遺伝子群を解析し、血管内増殖機構に関与する重要な遺伝子群を明らかにする。他方、種々のリンパ腫細胞株との比較を行うことによって、血管内増殖にとって普遍的に重要な遺伝子群を見つけ出せると考えられる。またIVL細胞株を用いてIVLのモデルマウス作製を試みる。

増殖機構、特に血管内での増殖機構を解明し、その知見を元に有用なモノクローナル抗体や低分子薬を得ることにより、悪性リンパ腫の白血化、腫瘍細胞の血管内増殖を阻止する新たな治療法を開発できる可能性がある。微量な白血化の阻止は悪性リンパ腫細胞のリンパ節外での増殖阻止につながり、ひいては病期の進行を食い止めるか、少なくとも遅らせることにつながることを期待される。ことに最近増加している高齢な悪性リンパ腫の患者では、腫瘍の根絶である治癒を望みにくく、腫瘍の進展をいかに遅らせるかが治療戦略上の鍵となる。悪性リンパ腫の血管内増殖を阻害し、白血化を阻止する薬剤の開発が可能となれば、限局期から進行期への進展を阻止、あるいは遅らせることができ、治癒率向上、また治癒に至らなくとも寿命を延長することが可能となると考えられる。

今回学内グラント終了時報告における実験目的: CD29 ($\beta 1$ -integrin), CD54 (ICAM-1) などの接着因子発現の消失が血管外に遊走できずに血管内で増殖する原因とするPonzoni²⁾らの説をもとに、逆にCD29を発現するIVL細胞株SMCH-12におけるCD29発現と増

殖の関係を検定した。まず細胞接着機能を阻害する抗CD29抗体を用いて、その影響を検定した。CD29抗原は、130 kDaのインテグリン β 1鎖で、インテグリン α 1 \sim α 8と α Vサブユニットと非共有結合的に結合したヘテロダイマーとして発現する。CD29複合体は、CD29に結合する α 鎖に依存して、細胞間および細胞と細胞外マトリックスの接着を媒介する。今回用いたCD29抗体であるclone 4B4はCD29を介する接着に対して、接着を阻害する。

材料と方法

(1) IVL細胞株の基本特性の解析

細胞株：SMCH-12. 抗体：細胞表面マーカー用の各種モノクローナル抗体. 染色体, FISH解析：検査会社に委託。

(2) 細胞接着阻害実験

細胞株：SMCH-12. CD29抗体(clone 4B4, ベックマン・コールター社). 約 1×10^5 /mlの細胞液を調整し、96穴プレートに各200 μ l/wellずつ分注し、CD29抗体を最小0.5%量から最大16%量まで、添加した。37°C, 5% CO₂濃度下にて3日間培養し、凝集状態、増殖状態を検定した。

結果

(1) SMCH-12細胞株の基本的特性

増殖と形態：細胞塊を形成しつつ増殖する(図1-A)。細胞形態は、細胞質が広く、細胞辺縁および核は不整形を示した(図1-B)。なおEBV感染は陰性であった。細胞表面マーカー：CD19, CD20, κ 鎖, CD5陽性であった。接着因子としてはCD29(β 1-integrin), CD54(ICAM-1), CD11a, CD18(β 2-integrin)の発現が認められた。免疫グロブリン遺伝子、重鎖、軽鎖 κ の再構成を認めた。染色体解析：t(9;19)(q13;q11;q22), t(11;13)(q21;q21), などの多彩な異常を認めた。

(2) 細胞接着阻害実験

CD29抗体を最小0.5%量から最大16%量まで添加したが、細胞凝集状態、細胞増殖状態に差異は認められなかった。

考察

SMCH-12においてCD29(β 1-integrin)を介した細胞接着を抗体で阻害しても凝集塊は形成されず、増殖状態にも影響は無かったことより、血管内増殖にCD29は大きな関与は無いと考えられる。今後、マイクロRNAを用いてCD29発現を抑制する実験を計画中である。また、CD54を介する接着を阻害する実験も予定している。

本研究について今後はGFPやLacZを恒常的に発現

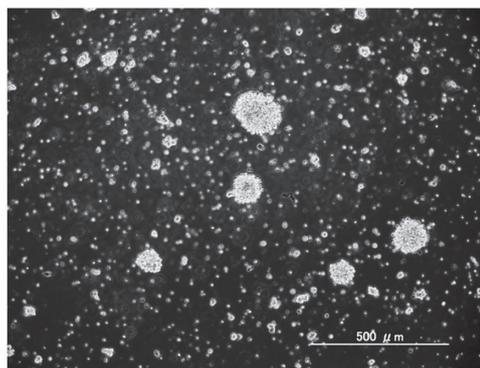


図1-A. SMCH-12の増殖像. 位相差顕微鏡を用いて観察. SMCH-12は凝集塊を形成しながら増殖していた。

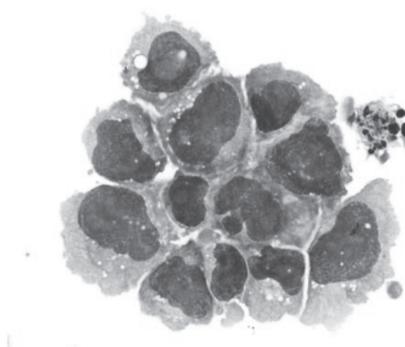


図1-B. SMCH-12の形態像. サイトスピン標本. May-Giemsa染色. 細胞質が広く、細胞辺縁および核は不整形を示した。

するIVL細胞株の作成を行う予定で、現在SMCH-12へのGFP発現ベクター遺伝子導入のための基礎的実験を行っている。このマーカーを発現する細胞株を用いて、マウスモデルの作製を試みて、IVLモデルマウスを用いて血管内増殖を阻害する薬剤の検定を行う計画である。

謝辞

本研究に対して多大な御支援、御協力をいただいた総合医療センター血液内科、大学病院血液内科の先生方に深謝いたします。

参考文献

- 1) Dolcetti R, et al. Establishment and characterization of a leukemic murine cell line derived from MCF 247 MuLV-induced T-cell lymphoma. *Int J Cancer* 1990 May 15;45(5):928-34.
- 2) Ponzoni M, et al. Lack of CD 29 (beta1 integrin) and CD 54 (ICAM-1) adhesion molecules in intravascular lymphomatosis. *Hum Pathol* 2000 Feb;31(2):220-6.

学内グラント 報告書

平成25年度 学内グラント終了時報告書

泌尿器がんにおける EBAG9 発現がもたらす微小環境変化と
腫瘍増殖メカニズムの関係

研究代表者 宮崎 利明 (ゲノム医学研究センター)

本研究では、泌尿器がんにおけるEBAG9発現がもたらす微小環境変化と腫瘍増殖メカニズムの関係を明らかにする目的で、EBAG9特異的抗体を作製してウェスタンブロット法による抗体の特異性を検証し、がん臨床検体における免疫組織化学的解析に応用し、その有用性を実証した。

研究代表者が所属する研究室では、乳がん細胞より、エストロゲン受容体がゲノムに結合する部位をクローニングする手法を用いて、数種類のエストロゲン応答遺伝子の同定に成功し、その1つとして estrogen receptor-binding fragment associated antigen 9 (EBAG9) を同定した¹⁾。EBAG9はエストロゲン標的組織だけでなく、脳、肝臓、心臓、リンパ節、腎臓など多彩な臓器で発現している。EBAG9は、様々ながんにおいても高発現が認められており、前立腺がん²⁾、腎細胞がん³⁾、膀胱がん⁴⁾、精巣がん⁵⁾などの泌尿器がんをはじめ、肝細胞がん⁶⁾、卵巣がん⁷⁾、乳がん⁸⁾において発現上昇していることが報告されてきた。がん細胞の培養系において、EBAG9を過剰発現しても細胞増殖に変化はみられないが、細胞の移動能は亢進する。また、EBAG9を過剰発現させたがん細胞をマウスに皮下移植すると、腫瘍形成が促進する。さらに、形成された腫瘍内にEBAG9のsiRNAを投与すると、腫瘍増殖が抑えられることを所属研究室では報告してきた^{3,4)}。以上から、EBAG9は腫瘍本体において、増殖を直接制御している可能性と、腫瘍周辺の微小環境を変化させ腫瘍増殖を促進している可能性の両方向からのがん病態生理への関与が考えられている。EBAG9が微小環境に作用するメカニズムとして、がん細胞から分泌されたEBAG9が周囲の間質細胞や末梢リンパ球の受容体等に結合することにより作用を発揮する可能性も考えられる。ドイツの研究グループによるEBAG9ノックアウトマウスの解析では、EBAG9は細胞傷害効果に関する因子の細胞外分泌を阻害することによって、細胞傷害性T細胞の活性を

抑制するという報告もされている⁹⁾。このような変化が、がん周囲の微小環境において生じれば、がん細胞の免疫系からの回避に有利に働くことも想定される。しかしながら、EBAG9のがん細胞への直接的な作用およびがん免疫を介する作用については、未だ十分には解明されていない。

泌尿器がんにおけるEBAG9発現がもたらす微小環境変化と腫瘍増殖メカニズムの関係を明らかにする目的で、特異性の高いEBAG9モノクローナル抗体を独自に作製した。ヒトEBAG9遺伝子発現ベクターを導入した胎児腎上皮由来の培養細胞から細胞抽出液を調整し、ウェスタンブロット法によりEBAG9モノクローナル抗体の特異性を検証した。次に、がん臨床検体における抗体のEBAG9蛋白質検出能力を検討するため、既にいくつかの蛋白質発現性と予後相関解析に成功している乳がん病理組織を用いて、免疫組織化学を施行した。乳がんは、泌尿器がんの一つである前立腺がんと同様、ホルモン依存性がんであり、両者ともにホルモン受容体に対する内分泌療法が初期には有効であるが、病態の進展により、ホルモン治療抵抗性を示すことが問題になるなどの共通点を多く有している。乳がん病理組織を用いての研究は、埼玉医科大学倫理委員会の承認が得られている。乳がん手術検体を、本研究で作製したEBAG9モノクローナル抗体を用いて免疫組織化学的検討を行った。EBAG9免疫染色性は、がん細胞の細胞質を中心に検出された。本研究において検討を行った乳がんでは、全例、術後のホルモン治療(タモキシフェン)を行っており、術後5年以内に再発群と無再発群の2つのグループに分けて、予後相関解析を行った。その結果、無再発群よりも再発群において細胞質内でのEBAG9の免疫染色性が上昇していた。また、予後相関解析においても、EBAG9陰性のがんよりもEBAG9陽性のがんを有する患者群において、無再発生存期間が短いことが示された。EBAG9の免疫染色性とリンパ節転移は、無再

発生存期間の独立した予測因子であった。以上から、EBAG9の免疫染色性は乳がんにおける予後不良の予測マーカーとして、診断と治療選択に役立つ可能性が示唆された。

本研究に加え、EBAG9は前立腺がん、膀胱がん、腎がん、精巣腫瘍をはじめとする各種泌尿器がんにおいても高発現していることから、泌尿器がんならびにその他のがんにおいても、予後予測因子ならびに治療法の選択のためのバイオマーカーとして臨床活用できる可能性が考えられる²⁻⁵⁾。EBAG9のがん増殖における作用機序については、EBAG9を過剰発現させたマウス腎がん細胞を用いた移植モデルにおいて、CD8⁺T細胞の腫瘍内への浸潤が減少する細胞傷害性T細胞を介するメカニズム³⁾や、細胞傷害効果に関する因子の細胞外分泌を阻害し、細胞傷害性T細胞の活性を抑制するメカニズム⁹⁾などが考えられる。EBAG9の抗腫瘍免疫における制御機能に加え、他のメカニズムが腫瘍増殖に関与する可能性も考えられている。すなわち、EBAG9依存的な細胞表面の糖鎖修飾の変化による細胞の増殖や移動能の上昇¹²⁾、腫瘍増殖や転移に好ましいがん微小環境の構築⁹⁾、増殖因子またはサイトカインの分泌を増加させることによる血管新生の促進などの可能性が想定される¹³⁾。EBAG9による抗腫瘍免疫の抑制、腫瘍細胞の転移能の亢進、血管新生の促進、ゴルジ体¹⁴⁾における役割などの作用メカニズムが、乳がんにおいてはホルモン治療耐性の獲得に関与し、がん病態悪化に作用する可能性が考えられる。実際に、本研究グラントにて泌尿器がんにおける臨床材料ならびに動物モデルを用いた検討を進めているが、詳細は未発表データのため先に原著論文で発表することとする。

本研究により、EBAG9のがん病態を探索する新しいツールとしての特異性が高い抗体が確立し、臨床検体を用いての免疫組織化学的解析により、がん病態の進行との予後相関を示すことが可能になった。泌尿器がん細胞を用いての動物モデルならびに泌尿器がん臨床検体での解析に、EBAG9抗体を活用し、未だ画期的治療の方法が少ない難治性泌尿器がんの病態解明と治療開発へ結びつけていきたい¹⁵⁾。

参考文献

- 1) Watanabe T, Inoue S, Hiroi H, Orimo A, Kawashima H, Muramatsu M. Isolation of estrogen-responsive genes with a CpG island library. *Mol Cell Biol* 1998;18:442-9.
- 2) Takahashi S, Urano T, Tsuchiya F, Fujimura T, Kitamura T, Ouchi Y, Muramatsu M, Inoue S. EBAG9/RCAS1 expression and its prognostic significance in prostatic cancer. *Int J Cancer* 2003;106:310-5.
- 3) Ogushi T, Takahashi S, Takeuchi T, Urano T, Horie-Inoue K, Kumagai J, Kitamura T, Ouchi Y, Muramatsu M, Inoue S. Estrogen receptor-binding fragment-associated antigen 9 is a tumor-promoting and prognostic factor for renal cell carcinoma. *Cancer Res* 2005;65:3700-6.
- 4) Kumagai J, Urano T, Ogushi T, Takahashi S, Horie-Inoue K, Fujimura T, Azuma K, Muramatsu M, Ouchi Y, Kitamura T, Inoue S. EBAG9 is a tumor-promoting and prognostic factor for bladder cancer. *Int J Cancer* 2009;124:799-805.
- 5) Fujimura T, Takahashi S, Urano T, Xiaoqiang L, Ogushi T, Muramatsu M, Ouchi Y, Kitamura T, Homma Y, Inoue S. Estrogen receptor-binding fragment-associated gene 9 expression and its clinical significance in human testicular cancer. *Int J Urol* 2009;16:329-32.
- 6) Aoki T, Inoue S, Imamura H, Fukushima J, Takahashi S, Urano T, Hasegawa K, Ogushi T, Ouchi Y, Makuuchi M. EBAG9/RCAS1 expression in hepatocellular carcinoma: correlation with tumour dedifferentiation and proliferation. *Eur J Cancer*, 2003;39:1552-61.
- 7) Akahira JI, Aoki M, Suzuki T, Moriya T, Niikura H, Ito K, Inoue S, Okamura K, Sasano H, Yaegashi N. Expression of EBAG9/RCAS1 is associated with advanced disease in human epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer* 2004;90:2197-202.
- 8) Suzuki T, Inoue S, Kawabata W, Akahira J, Moriya T, Tsuchiya F, Ogawa S, Muramatsu M, Sasano H. EBAG9/RCAS1 in human breast carcinoma: a possible factor in endocrine-immune interactions. *Br J Cancer* 2001;85:1731-7.
- 9) Rüder C, Höpken UE, Wolf J, Mittrücker HW, Engels B, Erdmann B, Wollenzin S, Uckert W, Dörken B, Rehm A. The tumor-associated antigen EBAG9 negatively regulates the cytolytic capacity of mouse CD8⁺ T cells. *J Clin Invest* 2009;119:2184-203.
- 10) Platet N, Cathiard AM, Gleizes M, Garcia M. Estrogens and their receptors in breast cancer progression: a dual role in cancer proliferation and invasion. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004;51:55-67.
- 11) O'Lone R, Frith MC, Karlsson EK, Hansen U. Genomic targets of nuclear estrogen receptors. *Mol Endocrinol* 2004;18:1859-75.
- 12) Julien S, Adriaenssens E, Ottenberg K, Furlan A, Courtand G, Vercoutter-Edouart AS, Hanisch FG, Delannoy P, Le Bourhis X. ST6GalNAc I expression in MDA-MB-231 breast cancer cells greatly modifies

- their O-glycosylation pattern and enhances their tumorigenicity. *Glycobiology* 2006;16:54-64.
- 13) Sonoda K, Miyamoto S, Yamazaki A, Kobayashi H, Nakashima M, Mekada E, Wake N. Biologic significance of receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells (RCAS1) as a pivotal regulator of tumor growth through angiogenesis in human uterine cancer. *Cancer* 2007;110:1979-90.
- 14) Migita T, Inoue S. Implications of the Golgi apparatus in prostate cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 2012;44:1872-6. Review.
- 15) Kumagai J, Takahashi S, Homma Y, Inoue S. EBAG9 as a tumor-promoting factor for bladder cancer. *Bladder cancer: Etymology, Diagnosis, and Treatments* 2010;187-93.
- 2) Takagi K, Ito S, Miyazaki T, Miki Y, Shibahara Y, Ishida T, Watanabe M, Inoue S, Sasano H, Suzuki T. Amyloid precursor protein in human breast cancer: An androgen-induced gene associated with cell proliferation. *Cancer Sci* 2013;104:1532-8. 表紙, ハイライト.

学会発表

- 1) 丸山洋二郎, 宮崎利明, 池田和博, 堀江公仁子, 岡本康司, 竹田省, 井上聡. 前立腺がん細胞における抗アンドロゲン薬耐性に関わる遺伝子 RPL31 の機能スクリーニングによる同定, 第 87 回日本内分泌学会学術総会, 2014/4/24-26, 福岡国際会議場・福岡サンパレス(福岡市)
- 2) 宮崎利明, 池田和博, 堀江公仁子, 井上聡. 担癌宿主側免疫系細胞における EBAG9 は in vivo での腫瘍増殖・転移制御する, 第 36 回日本分子生物学会, 2013/12/3-6, 神戸ポートアイランド(神戸市)
- 3) 宮崎利明, 池田和博, 堀江公仁子, 井上聡. 宿主側 EBAG9 欠失による腫瘍増殖・転移の抑制メカニズム, 第 11 回 RCGM フロンティアシンポジウム, 2013/11/22-23, 埼玉医科大学日高キャンパス・創立 30 周年記念講堂(日高市)

研究成果リスト

論文

- 1) Ijichi N, Shigekawa T, Ikeda K, Miyazaki T, Horie-Inoue K, Shimizu C, Saji S, Aogi K, Tsuda H, Osaki A, Saeki T, Inoue S. Association of positive EBAG9 immunoreactivity with unfavorable prognosis in breast cancer patients treated with tamoxifen. *Clin Breast Cancer* 2013;13:465-70.

学内グラント 報告書

平成25年度 学内グラント終了時報告書

ビタミンK依存性 γ -グルタミルカルボキシラーゼの生体における
新たな役割の解明

研究代表者 柴 祥子 (ゲノム医学研究センター)

本研究では、ビタミンKの補因子として作用するビタミンK依存性 γ -グルタミルカルボキシラーゼ (γ -glutamyl carboxylase ; GGCX) の生体における新たな役割の解明のため、GGCXの臓器特異的動物モデルを作製した。肝臓における機能解析により、本酵素の作用不足は出血傾向を高め、さらに寿命に影響することを明らかにした(成果論文1)。本研究内容はGGCXを介するビタミンKの臓器特異的作用の詳細を明らかにするものとして、新聞やインターネットで広く報道され、社会的関心を集めた。

ビタミンKは、1929年に発見された脂溶性ビタミンであり、血液凝固因子や骨代謝に深く関わることが知られている。本邦では、正常な血液凝固作用を維持するために、厚生労働省が2010年度版食事摂取基準の中でビタミンKの目安量を定めている。ビタミンKは、脂質を含まない食餌でヒヨコを飼育していた際に出血しやすい現象から、Henrick Damにより、1929年に発見された。彼は1943年にノーベル生理学・医学賞を受賞している。ビタミンKは、2-メチル-1,4-ナフトキノンを経典骨格とし、側鎖の構造の違いから、自然界には、緑黄色野菜・海藻類・緑茶・植物油などに多く含まれるビタミンK₁(フィロキノン)と、微生物や腸内細菌によって合成されるビタミンK₂(メナキノン類)の2つのビタミンKが存在する。ビタミンK₃(メナジオン)は合成化合物として知られている。ビタミンKの主要な機能の一つとして、ビタミンK依存性 γ -グルタミルカルボキシラーゼ (γ -glutamyl carboxylase ; GGCX) の補因子として働くことが1970年代から知られてきた¹⁻³⁾。GGCXは、標的タンパク質中のグルタミン酸残基を γ -カルボキシグルタミン酸(Gla)残基へと変換することにより、Gla化 (γ -カルボキシル化) 翻訳後修飾をもたらす、生理的な活性をもつGlaタンパク質として成熟させる重要な役割を担っている。ビタミンK依存性Gla化タンパク質としては、これまでに、

肝臓に存在する第II, VII, IX, X血液凝固因子やプロテインC, プロテインS, プロテインZ⁴⁾、骨組織に存在する骨基質タンパク質のオステオカルシン(osteocalcin ; OC, 別名 bone Gla protein ; BGP)⁵⁾やマトリックスGla化タンパク質(matrix Gla protein ; MGP)⁶⁾などがこれまでに知られており、GGCX自身もGla化を受ける⁷⁾。一方で、GGCXおよび、Gla化タンパク質は、肝臓、脾臓、肺、膵臓、生殖腺、胎盤、胸腺、甲状腺、軟骨、子宮などにおいても広く発現が認められていることから、多様な組織において作用していると想定されるが、血液凝固系と骨組織以外におけるビタミンKの作用については解明されておらず、新たなビタミンK依存性Gla化タンパク質の存在も推測される。

研究代表者が所属するグループ(以下、本グループ)では、今までにGGCXを介する基質タンパク質のGla化修飾以外のビタミンKの作用の一つとして、核内受容体であるステロイドX受容体(SXR)のリガンドとして機能することを報告し^{8,9)}骨芽細胞系におけるSXR依存性の遺伝子発現調節^{8,9)}およびコラーゲン蓄積作用⁹⁾を明らかにしてきた。また、ビタミンKはプロテインキナーゼA(PKA)のリン酸化を介しても骨芽細胞系における遺伝子発現調節に関与し、GGCXおよびSXR以外の作用点をもつことを明らかにしてきた¹⁰⁾。

生体におけるビタミンKの詳細な機能を解明するためには、ビタミンK作用点であるGGCXとその標的となるGla化タンパク質、ビタミンK受容体となるSXRなどの発現を改変した動物での機能解析が必要と考えられる。本グループでは、マウスSXRオルソローグのPXR欠損マウスを用いて、骨密度測定による骨形態観察を行い、PXR欠損マウスでは骨量減少を認めたことから、SXRが骨代謝の調節因子として重要である可能性を示した¹¹⁾。

生体におけるGGCXの機能解析については、全ての組織でGGCXを欠損させたノックアウトマウス

の表現型が過去に報告されている¹²⁾。このマウスでは、胎生期の9.5日から18日と生後間もない期間に出血が原因で致死となるため、GGCXの各組織における機能は未解明な点が多い。また、GGCXによりGla化を受け活性化される血液凝固因子のうち、第II因子の欠損マウスと第X因子の欠損マウスはともに、二次的ではあるが胎生致死であることが報告されている^{13,14)}。第II因子の欠損マウスは、卵黄嚢が青白く、血管内も空であり、胎生期の9.5～12.5日から心臓が拡張し始める。第X因子の欠損マウスは卵黄嚢や血管は正常だが、胎生期の11.5～12.5日から出血が原因で死亡する。これらの欠損マウスの表現型を考慮すると、*Ggcx*全身性欠損マウスの胎児は妊娠中期の発達に異常をきたしているかと推察できる。

このような背景の下、本研究では組織特異的にGGCXを欠損させたコンディショナルノックアウトマウス(cKO)を作製し、GGCXの機能解析を行うことを目的とした。cKOマウスの作製には、各組織で特異的に発現する遺伝子のプロモーターの下流にCre組換え酵素を挿入したCre発現トランスジェニックマウスと、*Ggcx*遺伝子前後にCreにより切断されるloxP配列を挿入した遺伝子型をホモに有する*Ggcx*^{lox/lox}マウスとを交配して作製した。本研究により、組織特異的にプロモーターに制御されるCreトランスジェニックマウスを用いることにより、組織特異的に*Ggcx*をノックアウトし、機能解析することが可能になった。

肝細胞特異的に発現するアルブミン(Albmin; *Alb*)のプロモーター支配下にCre組換え酵素を挿入したトランスジェニックマウス(*Alb-Cre*)を*Ggcx*^{lox/lox}と交配することにより、肝臓特異的にGGCXの酵素機能を低下させることに成功した。興味深いことに、肝臓特異的*Ggcx* cKOマウスでは、コントロールマウスと比較して、血漿中の血液凝固因子第II因子と第IX因子の活性は低下し、止血時間に著しい延長が認められた。しかしながら、一次止血機構で中心的役割を担う血小板の数を調べると、*Ggcx* cKOマウスではコントロールマウスと遜色がなかった。このことから、cKOマウスでの血液凝固時間の延長は、二次止血機構の著しい障害によることが示唆された。生存期間は、雌雄ともcKOマウスにおいて短命であることが認められ、特にcKO雄性マウスは雌性マウスよりも短命であることが明らかになった。死亡したマウスのほとんどで皮下組織に膨大な出血が観察されたことから、出血が直接的な死因であると推測された。

また、本研究で作製した肝臓特異的*Ggcx*欠損マウスは、血液凝固第II, IV因子活性が低下したにもかかわらず、胎生致死の全身性*Ggcx*欠損マウスよりは著しく長く生存できることが明らかになった。*Alb-Cre*のアルブミンプロモーターは胎生期の16.5日

頃から活性化するため¹⁵⁾、*Ggcx* cKOマウスでは、この時期まで*Ggcx*が存在すると考えられ、両者の表現型の相違をもたらすものと考えられる。

近年では、ビタミンK、特にK₂が骨粗鬆症治療薬で使われている^{16,17)}。ビタミンKの活性型が肝臓以外の組織においても認められることから¹⁸⁾、ビタミンKを補因子とするGGCXの様々な臓器特異的な機能については、さらに各種臓器に対する*Ggcx* cKOマウスを作製することによって解明できるものと期待される。本研究をさらに進展し、ビタミンK作用に基づく創薬開発へつなげていきたい。

参考文献

- 1) Plaza SM, Lamson DW. Vitamin K₂ in bone metabolism and osteoporosis. *Altern Med Rev* 2005;10:24-35.
- 2) Nelsestuen GL, Zytkevich TH, Howard JB. The mode of action of vitamin K. Identification of gamma-carboxyglutamic acid as a component of prothrombin. *J Biol Chem* 1974;249:6347-50.
- 3) Stenflo J, Fernlund P, Egan W, Roepstorff P. Vitamin K dependent modifications of glutamic acid residues in prothrombin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1974;71:2730-3.
- 4) Rezaie AR, Bae JS, Manithody C, Qureshi SH, Yang L. Protein Z-dependent protease inhibitor binds to the C-terminal domain of protein Z. *J Biol Chem* 2008;283:19922-6.
- 5) Price PA, Otsuka AA, Poser JW, Kristaponis J, Raman N. Characterization of a gamma-carboxyglutamic acid-containing protein from bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1976;73:1447-51.
- 6) Luo G, Ducy P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, Karsenty G. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 1997;386:78-81.
- 7) Berkner KL, Pudota BN. Vitamin K-dependent carboxylation of the carboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:466-71.
- 8) Tabb MM, Sun A, Zhou C, Grün F, Errandi J, Romero K, Pham H, Inoue S, Mallick S, Lin M, Forman BM, Blumberg B. Vitamin K2 regulation of bone homeostasis is mediated by the steroid and xenobiotic receptor SXR. *J Biol Chem* 2003;278:43919-27.
- 9) Ichikawa T, Horie-Inoue K, Ikeda K, Blumberg B, Inoue S. Steroid and xenobiotic receptor SXR mediates vitamin K2-activated transcription of extracellular matrix-related genes and collagen

- accumulation in osteoblastic cells. *J Biol Chem* 2006;281:16927-34.
- 10) Ichikawa T, Horie-Inoue K, Ikeda K, Blumberg B, Inoue S. Vitamin K2 induces phosphorylation of protein kinase A and expression of novel target genes in osteoblastic cells. *J Mol Endocrinol* 2007;39:239-47.
- 11) Azuma K, Casey SC, Ito M, Urano T, Horie K, Ouchi Y, Kirchner S, Blumberg B, Inoue S. Pregnane X receptor knockout mice display osteopenia with reduced bone formation and enhanced bone resorption. *J Endocrinol* 2010;207:257-63.
- 12) Zhu A, Sun H, Raymond RM Jr, Furie BC, Furie B, Bronstein M, Kaufman RJ, Westrick R, Ginsburg D. Fatal hemorrhage in mice lacking gamma-glutamyl carboxylase. *Blood* 2007;109:5270-5.
- 13) Sun WY, Witte DP, Degen JL, Colbert MC, Burkart MC, Holmbäck K, Xiao Q, Bugge TH, Degen SJ. Prothrombin deficiency results in embryonic and neonatal lethality in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:7597-602.
- 14) Dewerchin M1, Liang Z, Moons L, Carmeliet P, Castellino FJ, Collen D, Rosen ED. Blood coagulation factor X deficiency causes partial embryonic lethality and fatal neonatal bleeding in mice. *Thromb Haemost* 2000;83:185-90.
- 15) Wan YJ, An D, Cai Y, Repa JJ, Hung-Po Chen T, Flores M, Postic C, Magnuson MA, Chen J, Chien KR, French S, Mangelsdorf DJ, Sucov HM. Hepatocytesspecific mutation establishes retinoid X receptor alpha as a heterodimeric integrator of multiple physiological processes in the liver. *Mol Cell Biol* 2000;20:4436-44.
- 16) Shiraki M, Shiraki Y, Aoki C, Miura M. Vitamin K2 (menatetrenone) effectively prevents fractures and sustains lumbar bone mineral density in osteoporosis. *J Bone Miner Res* 2000;15:515-21.
- 17) Cockayne S, Adamson J, Lanham-New S, Shearer MJ, Gilbody S, Torgerson DJ. Vitamin K and the prevention of fractures: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Intern Med* 2006;166:1256-61.
- 18) Nakagawa K, Hirota Y, Sawada N, Yuge N, Watanabe M, Uchino Y, Okuda N, Shimomura Y, Sahara Y, Okano T. Identification of UBIAD1 as a novel human menaquinone-4 biosynthetic enzyme. *Nature* 2010;468:117-21.

研究成果リスト

原著論文

- 1) Azuma K, Tsukui T, Ikeda K, Shiba S, Nakagawa K, Okano T, Urano T, Horie-Inoue K, Ouchi Y, Ikawa M, Inoue S. Liver-specific γ -glutamyl carboxylase-deficient mice display bleeding diathesis and short life span. *PLoS One* 2014;9(2):e88643.
- 2) Ikeda K, Shiba S, Horie-Inoue K, Shimokata K, Inoue S. A stabilizing factor for mitochondrial respiratory supercomplex assembly regulates energy metabolism in muscle. *Nat Commun* 2013;4:2147.

総説

- 1) 柴祥子, 井上聡. ビタミンKと骨代謝. *Vitamins (Japan)* 2014;88(1):18-24.

学会発表

- 1) 柴祥子, 池田和博, 堀江公仁子, 津久井通, 近藤志穂, 小路武彦, 井上聡. ビタミンK依存性 γ -グルタミルカルボキシラーゼをセルトリ細胞特異的に欠失したマウスは雄性不妊を呈する, 第32回日本アンドロロジー学会学術大会ならびに総会, 2013年7月26-27日, 大阪府大阪市:学会賞受賞(基礎部門)
- 2) 柴祥子, 池田和博, 堀江公仁子, 井上聡. COX7RPはミトコンドリアの呼吸活性を制御しその発現により動物個体レベルでの運動持続能を向上させる, 第86回日本生化学会大会, 2013年9月11-13日, 神奈川県横浜市:鈴木紘一メモリアル賞受賞

特許出願

該当なし

学内グラント 報告書

平成25年度 学内グラント終了時報告書

発生段階での PPAR γ ノックアウトマウスの 選択的スプライシングバリエント制御解明 ～脂肪細胞分化誘導型 PPAR γ 1 遺伝子特異的プロモーター ノックアウトマウスの樹立～

研究代表者 井上 郁夫 (大学病院 内分泌内科・糖尿病内科)

緒言

ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 PPAR γ は核内受容体であり、レチノイドX受容体 (RXR) とヘテロダイマーを形成して、リガンド依存的に標的遺伝子のプロモーターに結合し、コリプレッサー、コアクチベーターと協調して標的遺伝子の転写量を調節する。PPAR γ は脂肪細胞分化のマスターレギュレーターであり、脂質代謝、インスリン感受性、動脈硬化等メタボリックシンドロームに関わる重要な因子として注目されている。この PPAR γ は哺乳類においていくつかの選択的スプライシングバリエントが存在することが知られ、マウスとヒトでそれぞれ報告されていて、異なるプロモーターで、それらの発現が厳格に制御されている。マウスの PPAR γ のスプライシングバリエントは、PPAR γ 1 と PPAR γ 2 のみで、一方、ヒトでは PPAR γ 1, PPAR γ 2, PPAR γ 3, PPAR γ 4 のみである¹⁾。しかしながら、我々は新たに、マウスにおいてスプライシングバリエント PPAR γ 1sv (accession number AB644275) を見出し、さらに、ヒトにおいてもスプライシングバリエント新規 hPPAR γ (accession number AB472042.1) を見出した。特に、現在、マウス胚において PPAR γ の3つのバリエントのうち、PPAR γ 1sv が最も多く発現し、遅れて、PPAR γ 1, PPAR γ 2 の発現が増加することを見いだしている²⁾。そこで今回我々は、マウス胚における PPAR γ の3つのバリエントの発生段階の選択的スプライシングバリエントの制御機構とその発現制御メカニズムを解明するため、まず、マウスにおいて、それぞれの特異的プロモーターを欠失させたノックアウト (KO) マウスを樹立しようと試みた。

材料と方法

Cre/lox と FRT/FLP の system で targeting construct を構築 (図 1A), エレクトロポレーションのために、株式会社トランスジェニック社 (神戸) に依頼する。構築したそのベクター DNA を導入した ES 細胞を、薬剤 (Neomycin) 選択により、Neomycin 耐性 ES 細胞を取得し、PCR による導入遺伝子を解析し、陽性の ES 細胞株を区別し得る。再度、株式会社トランスジェニック社 (神戸) で、ジャームライン・トランスミッションなどによりキメラマウス作成を依頼し、KO マウスを構築し、ES 細胞寄与率の高いキメラマウスと、野生型マウスと交配し、ヘテロ接合体型マウスを同定する。次に埼玉医科大学中央研究施設実験動物施設にて、誘導性 Cre マウス (B6;CBA-Tg(CAG-Cre)47Imeg, 熊本大学 生命科学系事務ユニット) との交配により、PPAR γ 1sv のプロモーター領域のエクソン (エクソン C) を欠失させる。

結果

Cre/lox と FRT/FLP の system で構築した targeting construct を図 1A で示す。エクソン C を loxP 配列で挟んだ Targeting Vector を作成・エレクトロポレーションのために、株式会社トランスジェニック社 (神戸) に依頼し、Targeting Vector DNA を ES 細胞に導入、Neomycin 薬剤耐性 ES 細胞を取得 (356 クローン) した。その中から、3 種の陽性の ES 細胞株を区別し、8 細胞期胚と ES 細胞のアグリゲーションによるキメラマウスを作製した。次に、ES 細胞寄与率の高い、exon C flox アレルが germline transmission したキメラマウスと、野生型マウスと交配し、ヘテロ接合体型マウスを作成し、これらのマウスからホモ接合体型マウス、

ヘテロ接合体型マウス, 野生型マウスをそれぞれ同定した。これらの同定は, *LoxP* primer set (図 1A) で PCR することでそれぞれを区別した (図 1B)。positive control としてカルシウム非依存性ホスホリパーゼ A2 (iPLA2) を用い, *loxP* 配列を含む場合 (700 bp) と *loxP* 配列を含まない場合 (500 bp) の PCR 産物でホモ接合体型マウス, ヘテロ接合体型マウス, 野生型マウスを区別した (図 1B)。次に得られたホモ接合体型マウス, exonC flox マウスに, Cre 組換え酵素を発現するトランスジェニックマウス, 誘導性 Cre マウス (B6;CBA-Tg(CAG-Cre)47Imeg) を交配させ, PPAR γ 1sv のプロモーター領域のエクソン C を欠失させた。LoxP primer set に加えて Neo primer (図 1A) も加え, PPAR γ 1sv (エ

クソン C) プロモーター領域欠失ホモ接合体型マウス・ヘテロ接合体型マウスを, 欠失されていない野生型マウスと区別した (図 1C)。次に, PPAR γ 1sv (エクソン C) プロモーター領域欠失ホモ接合体型マウスとそのヘテロ接合体型マウスを区別するため, 再度, *LoxP* primer set を用いた。PPAR γ 1sv (エクソン C) プロモーター領域欠失ホモ接合体型マウスは *loxP* 配列を含むので PCR 産物は 700 bp を示し, そのヘテロ接合体型マウスは誘導性 Cre マウス由来の *loxP* 配列を含まない PCR 産物 500 bp と, PPAR γ 1sv (エクソン C) プロモーター領域欠失ヘテロ接合体型マウス由来の *loxP* 配列を含む PCR 産物 700 bp を示すことで区別した。

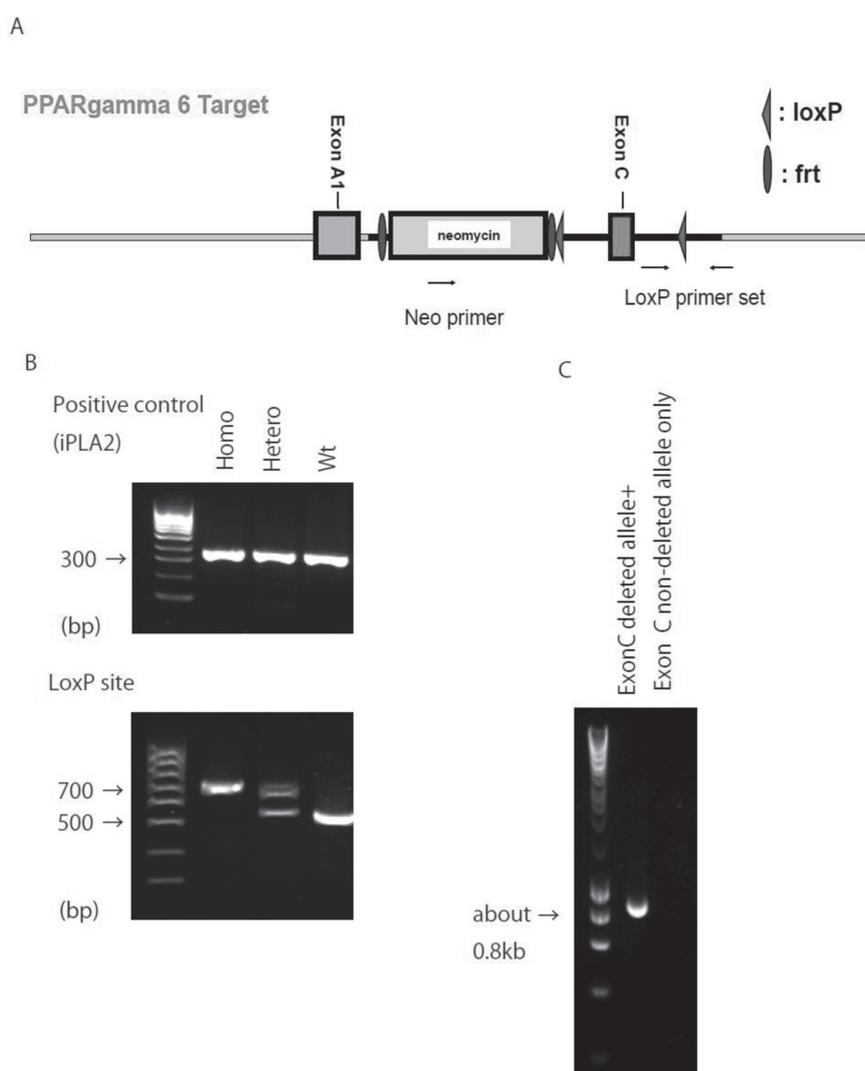


図 1. Cre/*lox* と FRT/FLP の system で構築した targeting construct とそれによるノックアウト (KO) マウスの同定。Cre/*lox* と FRT/FLP の system で構築した targeting construct と設定した primer の部位 (図 1A)。LoxP primer set (図 1A) で PCR すると, ホモ接合体型マウスでは *loxP* が挿入されているので PCR 産物は 700 bp となり, 野生型マウスでは *loxP* が挿入されていないので, PCR 産物は 500 bp となり, ヘテロ接合体型マウスの PCR 産物は 500 bp と 700 bp となり同定できる (図 1B)。LoxP primer set に加え Neo primer (図 1A) により, エクソン C のプロモーター領域を欠失したマウスでは 0.8 kb の PCR 産物が得られる。理由が明らかでないが, 欠失していないマウスでの LoxP primer set と Neo primer による PCR 産物は, 得られない (図 1C)。

考 察

先に述べたが、PPAR γ は哺乳類においていくつかの選択的スプライシングバリエントが存在することが知られ、マウス(図2)とヒト(図3)でそれぞれ報告されている。異なるプロモーターで、それらの発現が厳格に制御されている。マウスPPAR γ には、ヒトと同様に、今までPPAR γ 1およびPPAR γ 2、以上2つのアイソフォーム(選択的スプライシングバリエント)が知られている(図2)。PPAR γ 1の発現はエクソンA1

から転写され、多くの組織でユビキタスにみられ、脂肪細胞分化誘導に関わらないと言われている。一方、PPAR γ 2はエクソンBから転写され、脂肪組織に特異的に発現しており主に脂肪細胞分化誘導に関わる、とされている。また、翻訳開始コドン(ATG)がエクソンBとエクソンE1にあるため(図3)、PPAR γ 2蛋白の分子量はPPAR γ 1蛋白のそれより若干長い(図3, 4)。

我々は、以前から報告されたPPAR γ 1と異なるプロモーターである新規なスプライシングバリエントを発見し³⁾、特許とした⁴⁾。これが、PPAR γ 2と同様

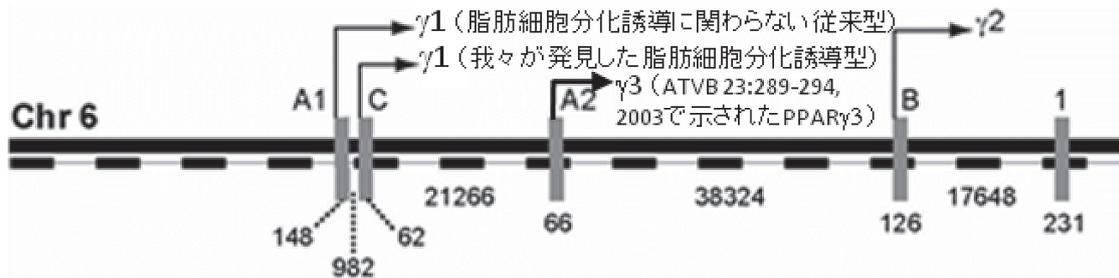


図2. マウスPPAR γ (mPPAR γ) の選択的スプライシングバリエントのプロモーター開始部位。脂肪細胞分化誘導に関わらないとされる従来型のmPPAR γ 1と、我々が見出した脂肪細胞分化誘導に関わるmPPAR γ 1(脂肪細胞分化誘導型 Ppar γ 1sv)。それぞれのプロモーター開始部位が異なる。Meirhaegheらが報告しているmPPAR γ 3のプロモーター開始部位も示した。

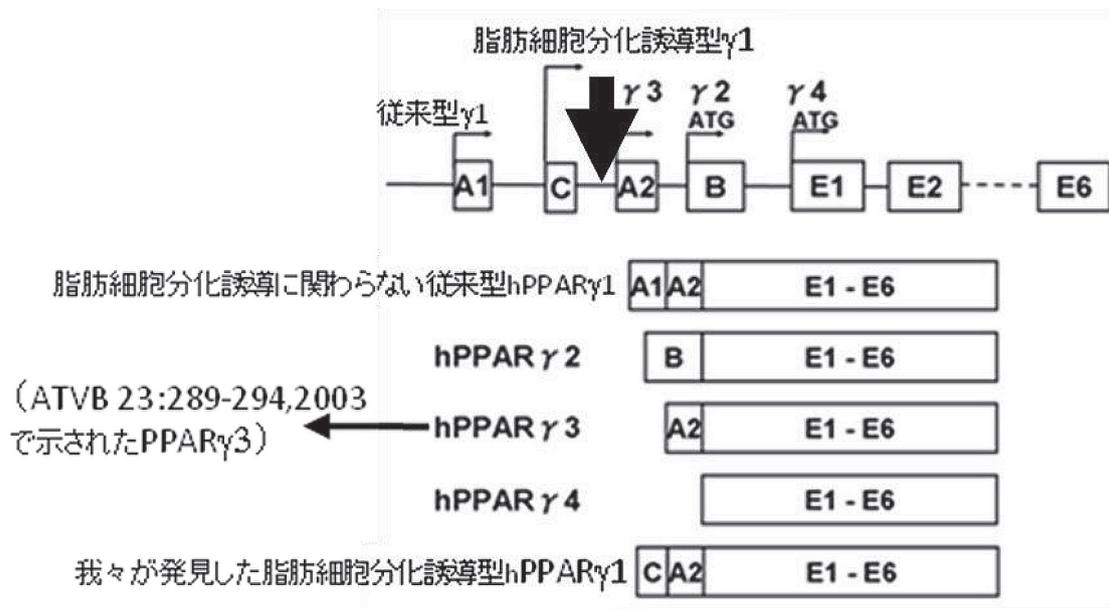


図3. ヒトPPAR γ (hPPAR γ) の選択的スプライシングバリエント。ヒトもマウスと同様に認められる。特に、Meirhaegheらが報告しているhPPAR γ 3のプロモーター開始部位と産物を矢印で示した。我々が見出した脂肪細胞分化誘導に関わるhPPAR γ 1(脂肪細胞分化誘導型 Ppar γ 1sv)の選択的スプライシングバリエントのサイズは、脂肪細胞分化誘導に関わらないとされる従来型のhPPAR γ 1と同程度を示す。翻訳開始コドン(ATG)がaxonE1にあるため脂肪細胞分化誘導型 Ppar γ 1svと従来型のhPPAR γ 1の産生される蛋白は同じとなる。

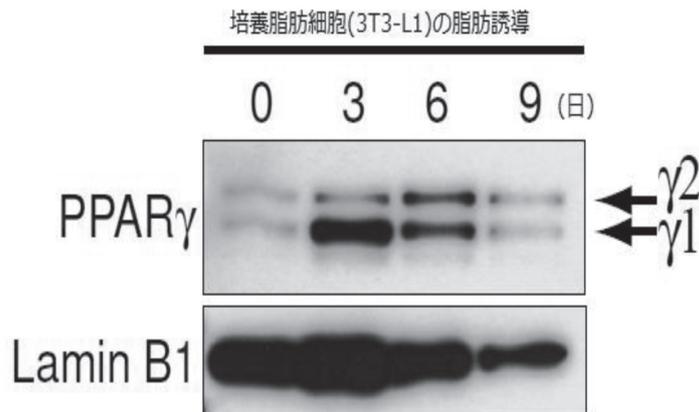


図4. マウスPPAR γ 1とPPAR γ 2の培養細胞での脂肪誘導した際の蛋白発現の違い(文献2から引用). 翻訳開始コドン(ATG)がaxonBとaxonE1にあるため(図3), PPAR γ 2蛋白の分子量はPPAR γ 1蛋白のそれより若干長い. 我々が見出した脂肪細胞分化誘導に関わるmPPAR γ 1(脂肪細胞分化誘導型 Ppar γ 1sv)の蛋白発現は, 脂肪誘導3日目に著しく増加し, 脂肪誘導9日目には, mPPAR γ 2と同程度に低下する.

に脂肪細胞分化誘導に関わることを証明²⁾したので Ppar γ 1svと名付け, 今回はさらに Ppar γ 1svを脂肪細胞分化誘導型 Ppar γ 1svとさらに名付けた.

今後, 得られたマウスはNeomycin 耐性遺伝子カセットを外すため, Flpトランスジェニックマウス(B6;D2-Tg(CAG-Flp)18Imeg, 熊本大学 生命科学系事務ユニット)との交配により, さらにNeomycin耐性遺伝子を欠失させる予定である. さらに, 脂肪細胞特異的なエクソンCをKOさせるため, 脂肪細胞特異的Creレコンビナーゼ(Cre)を発現するトランスジェニックマウスを入手して交配して, 解析を進める. 加えて, 現在, exonA1floxマウス作成が終了しているので, 上記と同様に, エクソンA1(図1A)のみを欠損したノックアウトマウス, エクソンA1およびCの両方(図1A)を欠損したKOマウス, それぞれのマウスの作成を試み, 比較検討を進める.

今回, 新リポ蛋白質の粒子径の決定法及びリポ蛋白質の粒子マーカーも確立したので⁵⁾, この該当遺伝子の特異的プロモーターのKOマウスの血中脂質のプロファイルの特徴も明らかとする.

参考文献

- 1) Meirhaeghe A, Fajas L, Gouilleux F, Cottel D, Helbecque N, Auwerx J, Amouyel P. A functional polymorphism in a STAT5B site of the human PPAR gamma 3 gene promoter affects height and lipid metabolism in a French population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:289-94.
- 2) Takenaka Y, Inoue I, Nakano T, Shinoda Y, Ikeda M, Awata T, Katayama S. A novel splicing variant of peroxisome proliferator-activated

receptor- γ (Ppar γ 1sv) cooperatively regulates adipocyte differentiation with Ppar γ 2. *PLoS One* 2013;8:e65583.

- 3) Takahashi S, Inoue I, Nakajima Y, Seo M, Nakano T, Kumagai M, Yang F, Komoda T, Awata T, Ikeda M, Katayama S. A promoter in the novel exon of hPPAR γ directs the circadian expression of PPAR γ . *J Atheroscler Thromb* 2010;7:73-83.
- 4) 【発明の名称】新規 PPAR γ プロモーター配列, 及びその応用【出願人】学校法人埼玉医科大学, 独立行政法人産業技術総合研究所【発明者】池田正明, 井上郁夫, 高橋誠一郎, 中島芳浩【特願番号】特願2009-116845【出願日】2009年5月13日
- 5) 【発明の名称】新リポ蛋白質の粒子径の決定法及びリポ蛋白質の粒子マーカー【出願人】学校法人埼玉医科大学, 株式会社明日香特殊検査研究所【発明者】井上郁夫, 高橋誠一郎, 金澤敏行, 松田武英【特願番号】特願2012-91395【出願日】2012年3月27日

研究成果リスト

論文

- 1) Yang F, Inoue I, Xu H, Kumagai M, Piao C, Takahashi S, Nakajima Y, Ikeda M. Real-Time Analysis of the Circadian Oscillation of the Rev-Erb β Promoter. *J Atheroscler Thromb* 2013;20:267-76.
- 2) Takenaka Y, Inoue I, Nakano T, Shinoda Y, Ikeda M, Awata T, Katayama S. A novel splicing variant of peroxisome proliferator-activated receptor- γ (Ppar γ 1sv) cooperatively regulates adipocyte differentiation with Ppar γ 2. *PLoS One*

- 2013;8:e65583.
- 3) Shirai K, Saiki A, Oikawa S, Teramoto T, Yamada N, Ishibashi S, Tada N, Miyazaki S, Inoue I, Murano S, Sakane N, Satoh-Asahara N, Bujo H, Miyashita Y, Saito Y. The effect of partial use of formula diet on weight reduction and metabolic variables in obese type 2 diabetic patients-Multicenter trial. *Obesity Res Clinical Prac* 2013;7:e43-e54.
 - 4) Seo M, Inoue I, Tanaka M, Matsuda N, Nakano T, Awata T, Katayama S, David H, Alpers DH, Komoda T. Clostridium butyricum MIYAIRI 588 improves high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in rats. *Dig Dis Sci* 2013;58:3534-44.
 - 5) Miida T, Nishimura K, Okamura T, Hirayama S, Ohmura H, Yoshida H, Miyashita Y, Ai M, Tanaka A, Sumino H, Murakami M, Inoue I, Kayamori Y, Nakamura M, Nobori T, Miyazawa Y, Teramoto T, Yokoyama S. Validation of homogeneous assays for HDL-cholesterol using fresh samples from healthy and diseased subjects. *Atherosclerosis* 2014;233:253-9.
- 特許出願**
- 1) 【発明の名称】脂質異常症または高脂血症の表現型を簡易的に分類および判定する方法【出願人】学校法人埼玉医科大学，株式会社明日香特殊検査研究所【発明者】井上郁夫，高橋誠一郎，金澤敏行，松田武英【特願番号】特願2012-116943【出願日】2012年5月7日
 - 2) 【発明の名称】新リポ蛋白質の粒子径の決定法及びリポ蛋白質の粒子マーカ【出願人】学校法人埼玉医科大学，株式会社明日香特殊検査研究所【発明者】井上郁夫，高橋誠一郎，金澤敏行，松田武英【特願番号】特願2012-91395【出願日】2012年3月27日
 - 3) 【発明の名称】新規PPAR γ プロモーター配列，及びその応用【出願人】学校法人埼玉医科大学，独立行政法人産業技術総合研究所【発明者】池田正明，井上郁夫，高橋誠一郎，中島芳浩【特願番号】特願2009-116845【出願日】2009年5月13日

学内グラント 報告書

平成24年度 学内グラント終了時報告書

携帯型眼振記録装置による、新しいめまい診療システムの確立

研究代表者 新藤 晋 (大学病院 耳鼻咽喉科)

緒言

Electro nystagmography (ENG), またはVideo nystagmography (VNG) を用いた眼振検査はめまいの診断に欠かせないが、装置の大きさのため、一般には耳鼻咽喉科外来など限られた環境でしか行なうことができない。一方、めまい発作は自宅など病院外で生じることが大半であるが、発作時間が短い、発作から耳鼻科受診までの日数が長い場合、耳鼻咽喉科外来受診時にはめまい発作がすでに治っていることが多い。このような場合、所見が乏しいために正確な診断が下せず、適切な治療が行なわれていないことがある。さらに診断のためにより多くの検査を必要としたり、必要以上の薬剤が投与される傾向にあることから、医療費抑制のためにもより正確な診断と的確な治療が多方面から強く望まれている。

これらの課題を克服すべく、1980年代から90年代にかけて携帯型ENGに関する論文がいくつか報告された^{1,2)}。しかしいずれの装置も、センサー(電極)の装着を患者自身が行なえないことに加え、発作時に速やかにセンサーの装着・記録が行なえる訳でなく、発作時に備え長時間装着したまま記録を行なう必要があること、記録中は顔面に複数のセンサーを装着したまま生活しなければならないこと、ENGでは眼振における3成分(水平・垂直・回旋)の内、回旋成分の計測ができないことなど問題点が多く、普及することはなかった。

携帯型ENGの報告とほぼ同じ頃から、VNGによる眼球運動記録法が開発された。VNGはENGと異なり、眼球の動きをCCD/CMOSなどの撮像素子を通して、ビデオ画像としてディスプレイ上に投影させたり、ハードディスクなどに記録して解析等を行なう方法である。VNGは映像をそのまま患者に見せることができることに加え、回旋成分の解析により眼球運動の3次元解析が可能となるなど、大きなインパクトをもたらした。但し、当時のVNGは最先端の技術であり、装置が大きく、また構成機器が高価であったことなどの

理由から、装置はすべて据え置き型であり、患者ひとりで操作可能な携帯型VNGは存在しなかった。

今回われわれは、病院外で不意に生じためまい発作時においても、患者自身が操作・記録可能な携帯型VNGの構築と、同装置を用いた新しいめまい診療システムの確立を目指した研究を行なった。

材料と方法

携帯型VNG 1号機(pVNG-1)の試作

永島医科器械製の遮眼用ゴーグル(IEM-2用)に民生用ワイヤレス式赤外線LED付小型CMOSカメラ及び無線受信機能付デジタルビデオレコーダーのセット(YK-873)を組み合わせることで、携帯型VNGを試作した(Fig.1)。

pVNG-1に使用している無線の安全性についての検証

pVNG-1は情報伝達に無線を用いている。無線はその周波数や電力の強度によっては、ペースメーカーを始めたとした他の医療機器への影響が考えられる。そのため、臨床の場で使用するには、装置が発生する無線が他の医療機器へ影響を及ぼさないか確認する



Fig. 1.

ことが必要である。そこで我々は、スペクトラムアナライザーを用いて、pVNG-1が発生する無線の周波数および電圧測定を行なった。

健常者をもちいた検討

対象は健常者7名。男性5例と女性2例、年齢は25歳から38歳、平均29.6歳であった。これらの被験者に対し、予め水平、垂直の各成分について10度較正を行なった後、温度眼振検査を行ない、出現した眼球運動の記録を行なった。方法は、まず仰臥位で頭部を約30度拳上した状態でpVNG-1を装着した。次に20℃の生理食塩水5 ccを約10秒かけて右もしくは左外耳道内に注入し、誘発された眼振を専用のレコーダーで記録した。

結果

pVNG-1に使用している無線の安全性について

カメラの電源をoffにした場合、周囲の無線機器が発する、IEEE.802.11g規格の最大約40 dBμVの電圧波形が記録された (Fig. 2a)。次に pVNG-1のカメラ電源をONにした所、IEEE.802.11gの電圧波形に加えて、pVNG-1が発する周波数2.430～2.435 GHz、最大電圧72.43 dBμVの電圧波形が記録された (Fig. 2b)。測定された最大電圧 (約70 dBμV) にアンテナ補正 (+30 dBμV) を行なうと電界強度 (E) = 約100 dBμV/m=0.1 V/mとなることから、電力P (W) の送信電波が距離r (m) 離れたところでの電界強度E (V/m) を示す式 (理想的な半波長ダイポールアンテナの場合)

$$E=7\sqrt{P/r}$$

にE=0.1 V/m, r=1 mを代入すると、最大電力 (P) は約0.2 mWであることが判明した。病院内で汎用さ

れており、他の医療機器への影響がないと認知されている無線LANの最大出力が10 mWであることから、pVNG-1が発生する無線は他の医療機器に影響を及ぼすことはなく、安全に使用できることが明らかとなった。

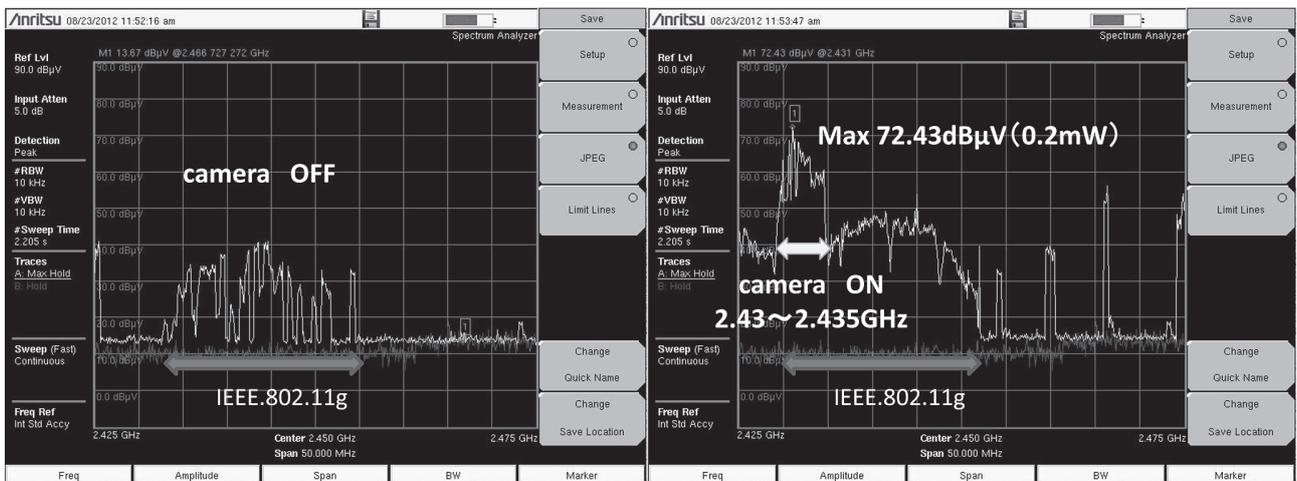
健常者をもちいた検討

全例において、明瞭な水平回旋性混合性眼振を視認することができた。さらに一例の眼球運動画像に対し、我々が従来から使用している眼球運動解析装置 (VIAS; video image analyze system) を用いて解析を行なった所、垂直成分の眼振は明らかでなかったものの、眼振の水平、回旋の各成分について解析が可能であった (Fig. 3a, b)。

考察

眼振検査は得られた眼球運動によりめまいの病巣を推定することが可能となることから、問診と並んでめまいの診療において欠かすことができない検査となっている。眼振検査には色々な種類があるが、中でも頭位眼振検査および頭位変換眼振検査は、めまいの原因で最も多い前庭性由来のめまい発作時に出現する異常な眼球運動を検出しやすいことから特に重要とされている。

めまい発作時もしくは発作直後には異常所見が高頻度で認められるが、めまい専門施設を紹介されて、精密検査を受けるまでの間にはめまいが治癒もしくは軽快し、眼振が認められなくなる症例を多く経験する。めまいの専門機関において、めまいを主訴に受診された患者の中で自発性眼振が認められる頻度は、注視眼振検査で19%、フレンツェル眼鏡を使用した眼振検査



a

b

Fig. 2.

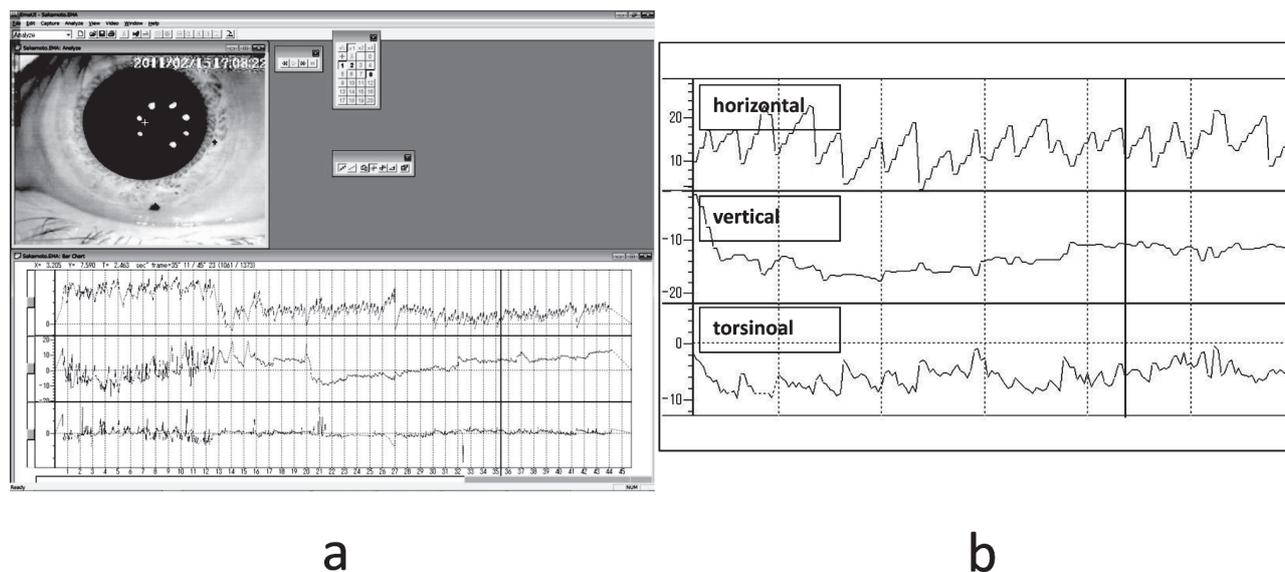


Fig. 3.

査で20%, 赤外線カメラを用いた眼振検査でも48%であり, 例え赤外線カメラを使用しても, 半数以上の患者で眼振が認められなかったとの報告がある. 以上の背景から, めまい発作時もしくは直後の眼球運動が記録できれば, 眼振の検出頻度が高まるのではないかと考えられるようになり, めまい発作時の眼振を記録することができる携帯型眼振記録計の必要性が認識されるようになった. 1970年~90年代には日本を中心に携帯型ENGの論文がいくつか報告された. 渡辺ら, 西川らはそれぞれ携帯型心電計やホルター心電計を使用もしくは応用した携帯型ENGを報告している. これらはいずれも睡眠時など長時間の記録に向いているが, 顔面に5つの電極を装着する必要がある. 発作時に5つの電極を患者自身が速やかに装着することは不可能であり, また装着したまま生活することも困難であることから, 普及することはなかった.

我々は, 日常診療において携帯型眼振記録計の必要性を考え続けた結果, 携帯型のVNGを構築すれば良いのではないかと考え, 研究を進めてきた. pVNG-1は, 長径14 cm, 重量380 gと軽量・小型の上, 起動から記録開始まで最短6秒で, 解像度, サンプルレートのとも, 現在汎用されている据え置き型VNGとほぼ同等の性能を有しており, 携帯型のVNGとして良好な性能を有していると考えられた.

カメラから記録装置への情報伝達の点から携帯型VNGの形態を考えた場合, ①無線による伝達, ②有線による伝達, ③カメラと記録装置が一体化, の3つが考えられる. pVNG-1は無線を使用して構築した. 無線の利点としてケーブルがないため取り回しが容易であり, 装置を軽量にすることができる. またゴーグルからモニターを取り外すことができるので, 撮影・記

録している最中に, 本人がモニターで画面を確認することができたり, 持ち運ぶ際に小さく分割できるなどのメリットがある. その反面, 無線を使用していることから, ペースメーカー等を使用している患者や他の医療機器への影響が危惧される. そこで実機を用いて無線の周波数・出力を測定した所, 周波数2.4 GHz, 出力は約0.2 mWであった. 日本の病院内で汎用されている無線LANの最大出力が10 mW, 心電図モニターなどで使用されている医用テレメーターの出力が約1 mWであることから, pVNG-1の無線は人体への影響がないことが明らかとなった. その他, 携帯型VNG共通の課題として, めまい発作で動揺している患者が独りで記録する場合, 眼球位置や焦点距離の調整が難しかったり, 瞬きが多い患者や上眼瞼が下垂している患者では, 眼振の確認, 解析が困難となることがある. これらの課題についてはさらなる装置並びにシステムの改良が必要と考えられる.

今まで, 携帯型眼振記録装置について研究があまり進んでおらず, 渉猟し得る限りで患者自身が操作・記録できる携帯型VOG/VNGは報告されていない. 携帯型VNGの適応はメニエール病や前庭神経炎, BPPVだけでなく, 小児良性発作性めまいや偏頭痛関連めまい, さらには恐怖性めまいなど病院外での眼振記録が望ましい反復性めまいすべてである. 携帯型VNGを適用することにより, 自宅など病院外で生じためまいについて, 実際眼振が認められるか, また認められた場合の眼振の強さ, 方向, 頻度等を確認することによって, より正確な診断, 治療が可能となることから, 今後さらなる発展が期待される領域である. 今後, 機器を改良し症例数を蓄積することで, より良い携帯型VNGシステムを構築していきたいと考えている.

謝 辞

本研究の実施にあたり，埼玉医科大学保健医療学部医用生体工学科 加納隆教授，川邊学先生には，pVNG-1に使用している無線の安全性に関する多大なご協力・ご指導を賜りました。心より感謝申し上げます。

引用文献

- 1) 西川恵子，他. 携帯用長時間記録眼振計の試作. 耳鼻臨床 1984;77(4):923-30.
- 2) 平塚仁志. 簡易携帯型眼振記録装置の臨床診断的有用性について. 耳鼻臨床(補) 1997;91:1-20.

研究成果リスト(論文, 学会発表, 特許出願)

学会発表

- 1) 新藤晋, 杉崎一樹, 池園哲郎, 柴崎修, 伊藤彰紀, 水野正浩, 加瀬康弘. 携帯型眼球運動記録装置の開発(第二報), 第22回日本耳科学会総会, 平成24年10月, 名古屋
- 2) 新藤晋, 池園哲郎, 杉崎一樹, 松田帆, 堤内亮博, 柴崎修, 伊藤彰紀, 水野正浩, 加瀬康弘. 携帯型ビデオ式眼振記録装置を用いためまい発作時の眼球運動記録, 平成24年度厚労省難治性疾患等克服研究事業 前庭機能異常に関する調査研究, 平成25年1月, 東京

学内グラント 報告書

平成24年度 学内グラント終了時報告書

新生児乳児開心術におけるMUF中白血球除去による
肺障害の予防に関する研究

研究代表者 鈴木 孝明 (国際医療センター 小児心臓外科)

研究分担者 山岸 俊介*

緒言

体外循環下開心術において、白血球活性化による血管内皮障害が術後の心筋障害や臓器障害の原因の一つであることが明らかとなってきた。これに対し白血球除去フィルターを体外循環の送血回路に使用することにより、活性化した白血球を体外循環中継続して除去し、術後の心筋障害や臓器障害を軽減できる可能性も指摘されているが、その効果は報告により異なる。これとは別に体外循環終了直後に血液の限外ろ過 (Modified Ultrafiltration, MUF) を行ない、血液中の血管作動物質やサイトカインを減少させることにより心筋障害や臓器障害を軽減できることも明らかとなり、多くの小児心臓外科施設で行われている。今回われわれは、体外循環の送血回路ではなくMUFの回路に白血球除去フィルターを装着することにより、MUF中に活性化した白血球を除去し、MUFの効果をさらに高め、心筋障害や臓器障害を防ぐことができると考え、検証することを目的とした。

対象と方法

対象は心室中隔欠損症、肺高血圧症に対して体外循環使用下に根治術を施行した一歳未満の乳児20例で、男児9例、女児11例、平均年齢は115.5日であった。無作為に選ばれた10例に対してはMUF中の白血球除去を行いフィルター群とした。その他の10例においては白血球除去を行わなかった (コントロール群)。白血球除去の方法は、従来の体外循環回路内のMUF回路にPole社製白血球除去フィルターを装着し、MUF中MUF回路内を通過する血液の白血球除去を行った。

白血球除去効果の指標として白血球数、白血球活性化の指標としてTNF- α 、および各種インターロイ

*国際医療センター 小児心臓外科

キンIL-1 β 、IL-6、IL10、および接着分子ICAM-1の測定を行った。測定はコントロールとして麻酔導入後加刀前、体外循環終了直後MUF開始前、MUF終了時、体外循環終了後24時間の計4ポイントで行った。また肺機能の指標として術中の肺動脈圧/体動脈圧、術中術後のPaO₂/FiO₂の測定を行い、心機能の評価としてCK-MB、Troponin Tの測定を行った。

結果

全例生存し合併症も認めなかった。両群間に年齢、体重、体外循環時間、心停止時間のいずれにも有意差を認めなかった。フィルター群は回路への充填量が多くなるため、使用RCCの量が有意に高かった (フィルター群377 \pm 20.6 mL、コントロール群286 \pm 46.0 mL, $p = 0.0004$) (表1)。白血球は有意にフィルター群が低かった ($p = 0.004$) (図1)。血中TNF- α 、および各種インターロイキンIL-1 β 、IL-6、IL10においては両群間に差は認められなかったが、接着分子ICAM-1についてはMUF後フィルター群で有意に低値であった ($P = 0.049$) (図2)。術中の肺動脈圧/大動脈圧 (PAP/AoP) 比、術中術後のPaO₂/FiO₂比は両群間で有意な差はなかった。術後CK-MB値 (フィルター群150.44 \pm 54.1 ng/mL、コントロール群160.43 \pm 68.7 ng/mL, $p = 0.72$)、Troponin T値 (フィルター群5.42 \pm 1.76 ng/mL、コントロール群7.14 \pm 3.75 ng/mL, $p = 0.23$) の平均値は有意差を認めないがフィルター群で低値の傾向を示した。

考察

結果を見ると統計学的な有意差を得ることは出来なかったが、術後サイトカイン値、CK-MB、Troponin Tの平均値はフィルター群で低い傾向がみられ、ICAM-1についてはMUF後有意に低下したことから、今回の研究では症例数が少なく断定することは不可能

であるが、MUF中の白血球除去が術後の心筋障害や臓器障害を軽減できる可能性が示唆されたと考える。

表 1.

Characteristic	Filter群	Control群	P-value
No	10	10	
Age, days mean(range)	116.8(64-185)	114.3(43-183)	0.45
Male-female	5:5	4:6	
Weight,kg mean(range)	4.99(3.20-6.14)	4.90(3.10-7.33)	0.42
Duration of operation,min mean±SD	238.3±22.0	230.6±36.1	0.29
Duration of CPB,min mean±SD	98.0±15.1	96.8±26.1	0.45
Duration of Aortic crossclamping,min mean±SD	54.7±15.1	54.5±18.7	0.49
Blood Transfusion (RCC),ml mean±SD	377±20.6	286±46.0	0.0004

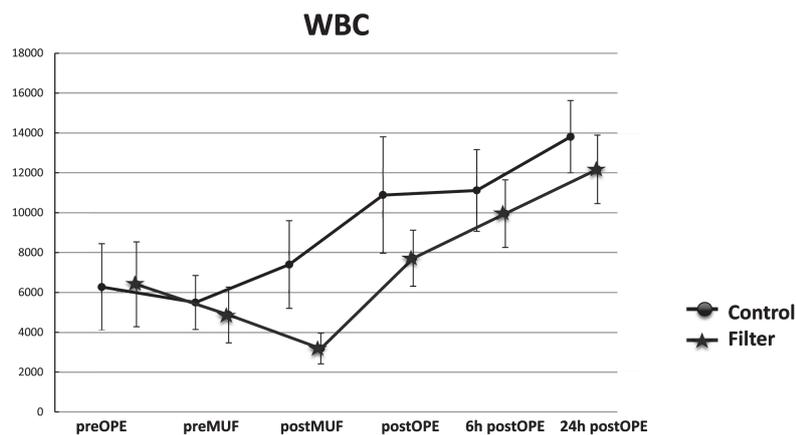


図 1.

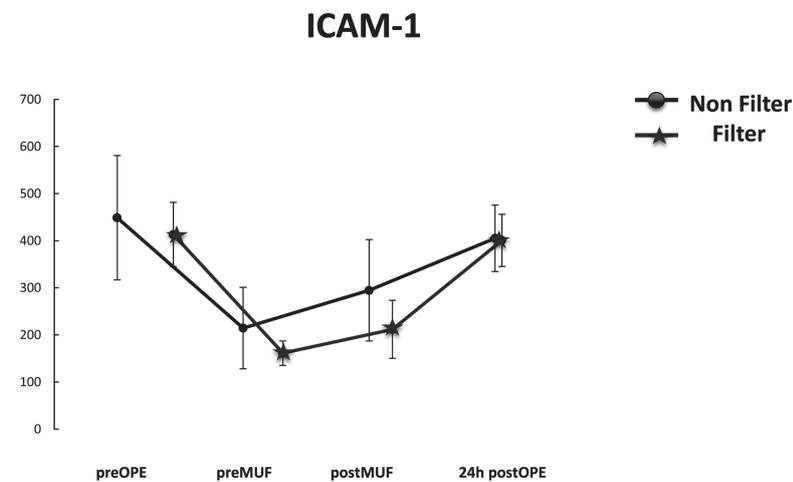


図 2.